

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201690376 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2016.07.29(22) Дата подачи заявки  
2014.08.13(51) Int. Cl. C07D 417/12 (2006.01)  
C07D 417/14 (2006.01)  
G01N 33/50 (2006.01)

## (54) ИНГИБИТОРЫ ДЕЗОКСИЦИТИДИНКИНАЗЫ

(31) 61/865,468

(32) 2013.08.13

(33) US

(86) PCT/US2014/050931

(87) WO 2015/023776 2015.02.19

(88) 2015.11.12

(71) Заявитель:

ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ;  
ДЗЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ИЛЛИНОЙС  
(US)

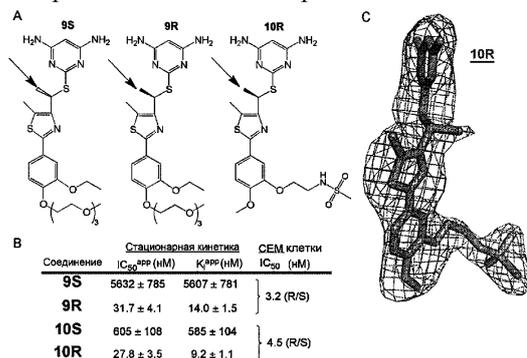
(72) Изобретатель:

Раду Каюс Г., Ли Чжэн, Гипсон  
Рэймонд М., Ван Дзуе, Сатиамурги  
Нагихеттиар, Лави Арнон, Мерфи  
Дженнифер М., Натансон Девид А.,  
Джунг Майкл Е. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе представлены соединения, которые связывают dCK, и способы лечения рака. Более конкретно, производные 2-фенилтиазола, связанные с 4,6-диаминопиримидиновым фрагментом, раскрыты как ингибиторы активности дезоксицитидинкиназы. Кроме того, представлены ингибиторы - соединения, имеющие стереоцентр. Данные соединения имеют терапевтическое применение в лечении рака.



A1

201690376

201690376

A1

## ИНГИБИТОРЫ ДЕЗОКСИЦИТИДИНКИНАЗЫ

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки США № 61/865468, поданной 13 августа 2013, которая включена в данный документ в виде ссылки в полном объеме во всех смыслах.

### ЗАЯВЛЕНИЕ КАСАТЕЛЬНО ПРАВ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ, СДЕЛАННЫЕ В СООТВЕТСТВИИ С ИССЛЕДОВАНИЕМ И РАЗРАБОТКОЙ, ФИНАНСИРОВАННЫМИ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА

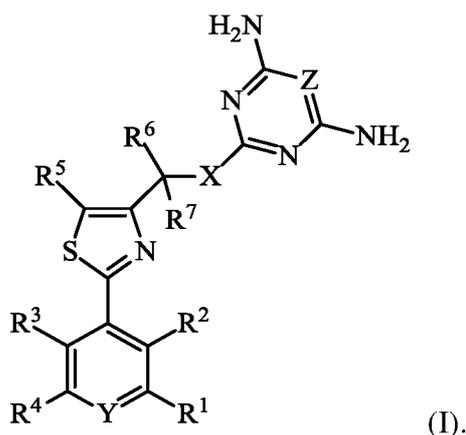
**[0002]** Данное изобретение было сделано при поддержке правительства по номерам грантов CA086306 и R01 EB013685, которые были предоставлены Национальному институту здоровья. Правительство имеет определенные права на изобретение.

### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0003]** Дезоксицитидинкиназа (dCK) представляет собой дезоксирибонуклеозидкиназу, способную фосфорилировать дезоксицитидин, дезоксиаденозин и дезоксигуанозин до их монофосфатных форм, используя или АТФ или УТФ как доноры фосфора.<sup>1</sup> Фосфорилирование dCK является лимитирующей скоростью стадией в биохимическом пути, отвечающим за превращение восстановленного дезоксицитидина в дЦТФ и, в определенных типах клеток в dTTP, делая их субстратами для ДНК полимераз. Кроме физиологической роли генерирования dNTP, dCK играет критическую роль в активации нескольких нуклеозидных аналогов пролекарств ('nucs'), что широко используется в противораковой терапии.<sup>2</sup> Соответственно, идентифицирование терапевтической направленности dCK имеет большое значение. Представленное в данном документе является решениями этих и других проблем в данной области.

## КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0004]** Представленными в данном документе являются соединения, которые имеют формулу:



В соединении формулы (I), Y представляет собой C(R<sup>8</sup>) или N. Z представляет собой C(R<sup>9</sup>) или N. X представляет собой CH<sub>2</sub>, O, N(R<sup>10</sup>), S, S(O) или S(O)<sub>2</sub>. R<sup>1</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>1A</sup>, -OR<sup>1A</sup>, -NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -C(O)OR<sup>1A</sup>, -C(O)NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>R<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>OR<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NHNR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -ONR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NHC(O)NHNR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил. R<sup>2</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>2A</sup>, -OR<sup>2A</sup>, -NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -C(O)OR<sup>2A</sup>, -C(O)NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>R<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>OR<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NHNR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -ONR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NHC(O)NHNR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил. R<sup>3</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>3A</sup>, -OR<sup>3A</sup>, -NR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -C(O)OR<sup>3A</sup>, -C(O)NR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>3A</sup>, -S(O)<sub>n3</sub>R<sup>3A</sup>, -S(O)<sub>n3</sub>OR<sup>3A</sup>, -S(O)<sub>n3</sub>NR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -NHNR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -ONR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -NHC(O)NHNR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил. R<sup>4</sup> представляет

с собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{4A}$ ,  $-OR^{4A}$ ,  $-NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-C(O)OR^{4A}$ ,  $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}R^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}OR^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NHN R^{4A}R^{4B}$ ,  $-ONR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{4A}R^{4B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.  $R^5$  независимо представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{5A}$ ,  $-OR^{5A}$ ,  $-NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-C(O)OR^{5A}$ ,  $-C(O)NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}R^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}OR^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NHN R^{5A}R^{5B}$ ,  $-ONR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{5A}R^{5B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил, где  $R^5$  и  $R^6$  необязательно объединяются с образованием замещенного или незамещенного циклоалкила;  $R^6$  представляет собой незамещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил или галоген (например F).  $R^7$  представляет собой H, D, F или  $-CH_3$ .  $R^8$  представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{8A}$ ,  $-OR^{8A}$ ,  $-NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-C(O)OR^{8A}$ ,  $-C(O)NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{8A}$ ,  $-S(O)_{n8}R^{8A}$ ,  $-S(O)_{n8}OR^{8A}$ ,  $-S(O)_{n8}NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NHN R^{8A}R^{8B}$ ,  $-ONR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{8A}R^{8B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.  $R^9$  представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{9A}$ ,  $-OR^{9A}$ ,  $-NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-C(O)OR^{9A}$ ,  $-C(O)NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}R^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}OR^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NHN R^{9A}R^{9B}$ ,  $-ONR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{9A}R^{9B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.  $R^{10}$  представляет собой H,  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$ ,  $-C_3H_7$ ,  $-CH_2C_6H_5$ .  $R^{1A}$ ,  $R^{1B}$ ,  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{8A}$ ,  $R^{8B}$ ,  $R^{9A}$  и  $R^{9B}$  независимо представляют собой водород, оксо, галоген,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-S(O)_2Cl$ ,  $-S(O)_3H$ ,  $-S(O)_4H$ ,  $-S(O)_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-NHS(O)_2H$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,

замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил. Символы n1, n2, n3, n4, n5, n8 и n9 независимо представляют собой 1, 2 или 3.

**[0005]** Кроме того, представленными в данном документе являются фармацевтические композиции. В одном аспекте фармацевтическая композиция является такой, которая включает соединение, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

**[0006]** Кроме того, представленными в данном документе являются способы ингибирования дезоксицитидинкиназы путем контактирования дезоксицитидинкиназы с эффективным количеством соединения, описанного в данном документе, тем самым, ингибируя дезоксицитидинкиназу.

**[0007]** Кроме того, представленными в данном документе являются способы лечения заболевания у субъекта, который в этом нуждается, путем введения эффективного количества соединения, которое описано в данном документе. В одном аспекте представлен способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, путем введения субъекту эффективного количества соединения, описанного в данном документе.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0008]** Фигура 1. Соединения-прототипы ингибиторов dCK. (A) Схематическое изображение соединений-прототипов **Ia** и **Ib**. Данные соединения состоят из четырех частей: Часть А означает пиримидиновое кольцо; часть В представляет собой линкер, присоединяющий 5-замещенное тиазольное кольцо (часть С), за которым следует фенильное кольцо (часть D). Соединения **Ia** и **Ib** отличаются заместителем, присутствующим в мета-положении фенила ( $R_m$ ). (B) Свойства *in vitro* ( $IC_{50}^{app}$  и  $K_i^{app}$ ) и в клетке ( $IC_{50}$ ) для **Ia** и **Ib**.

**[0009]** Фигура 2. Модификации пиримидинового кольца. (A) Схематическое изображение соединения **1**, которое имеет единственную экзоциклическую аминогруппу, и соединения **2**, которое имеет атом азота в кольце между двумя экзоциклическими аминогруппами. (B) Свойства *in vitro* ( $IC_{50}^{app}$  и  $K_i^{app}$ ) и в клетке ( $IC_{50}$ ) для **1** и **2**. C) Перекрытие структур dCK-2 и dCK-Ia с акцентом на пиримидиновое кольцо. Обратите внимание на сдвинутое на  $\sim 0,4 \text{ \AA}$  положение **2** по отношению к **Ia**, что происходит

вследствие присутствия молекулы воды (кружочек). Связывание данной молекулы воды становится возможным благодаря N-атому кольца в соединении **2**.

**[0010]** Фигура 3. Модификации мета-положения фенильного кольца. (A) Схематическое изображение соединений **3** и **4**, которые отличаются природой заместителя в мета-положении. (B) Свойства *in vitro* ( $IC_{50}^{app}$  и  $K_i^{app}$ ) и в клетке ( $IC_{50}$ ) для **3** и **4**. (C) Перекрытие структур dCK-3 и dCK-4 с акцентом на мета-положение фенильного кольца. Прочное связывание **4** по сравнению с **3** может быть логически обоснованным взаимодействием более длинного мета-заместителя с S144/S146 dCK.

**[0011]** Фигура 4. Модификации пара-положения фенильного кольца. (A) Схематическое изображение соединений **5** и **6**, которые отличаются природой заместителя в пара-положении. (B) Свойства *in vitro* ( $IC_{50}^{app}$  и  $K_i^{app}$ ) и в клетке ( $IC_{50}$ ) для **5** и **6**. (C) Перекрытие dCK-5 (сине-зеленый) и dCK-6 (бежевый) структур с акцентом на пара-положение фенильного кольца. Ингибиторы связываются чрезвычайно аналогичным образом; заместители в мета-положении вступают в прямое взаимодействие с ферментом, а пара-заместитель нет. Очень похожие значения  $IC_{50}^{app}$  и  $K_i^{app}$  **5** и **6** объясняются отсутствием прямых взаимодействий с ферментом через пара-положение. В отличие от этого, присутствие заместителя в пара-положении понижает определенное значение  $IC_{50}$  на основе клетки.

**[0012]** Фигура 5. Модификации линкера. (A) Схематическое изображение соединений **7** и **8**. Оба соединения были синтезированы как рацемическая смесь (R/S) – добавление метильной группы (стрелка) к метиленовой линкерной группе делает данные соединения хиральными. В свою очередь **7** имеет пропильную группу в 5-положении тиазольного кольца (R), **8** имеет метильную группу. (B) Свойства *in vitro* ( $IC_{50}^{app}$  и  $K_i^{app}$ ) и в клетке ( $IC_{50}$ ) для **7** и **8**. (C) Пропильная группа в тиазольном кольце дает **7** связываться, как единственной молекуле, с Положением-1 сайта связывания dCK (см. текст для деталей). Примечательно, несмотря на образование фермент-ингибитор с рацемическим **7**, в кристаллической структуре мы наблюдаем только R-изомер (соединение **7**, Fo-Fc пренебрегая отображением, контурированным при 2 сигма). Теоретическая модель S-изомера демонстрирует, что только R-изомер соответствует электронной плотности. (D) Метильная группа в тиазольном кольце допускает две молекулы **8**, чтобы связаться с dCK; одна в Положение-1 и одна в Положение-2. В Положении-1 мы наблюдаем только R-изомер (8R-P1; Fo-Fc, пренебрегая отображением, контурированным при 2 сигма).

Теоретическая модель S-изомера в Положении-1 отчетливо демонстрирует, что только R-изомер соответствует электронной плотности (стрелка). (E) В Положении-2 мы наблюдаем только S-изомер (8S-P2; Fo-Fc, пренебрегая отображением, контурированным при 1,5 сигма). Теоретическая модель R-изомера в Положении-2 отчетливо демонстрирует, что только S-изомер соответствует электронной плотности (стрелка).

**[0013]** Фигура 6. R-изомер является соответствующим изомером по отношению к ингибированию dCK. (A) Схематическое изображение соединений 9S, 9R и 10R (R или S обозначает хиральность метиленового углерода линкера; стрелка указывает на добавленную метильную группу). (B) Свойства *in vitro* ( $IC_{50}^{app}$  и  $K_i^{app}$ ) и в клетке ( $IC_{50}$ ) для 9S, 9R и 10R. R-изомер как 9, так и 10 является ответственным за наблюдаемое ингибирование фермента. (C) dCK кристаллизовали в присутствии энантиомерно чистого 10R, и устанавливали структуру комплекса фермент-ингибитор. Fo-Fc, пренебрегая отображением (1,6 сигма) для Положения-1 сайта связывания отчетливо показывает присутствие 10R. Несмотря на тиазольную метильную группу в 10R (которая совместима с молекулами, которые также связываются с Положением-2), мы не наблюдаем второй 10R молекулы в Положение-2. Это согласуется с результатами для соединения 8 (Фигура 5), которые показали, что только S-изомер связывается с Положением-2.

**[0014]** Фигура 7. Хиральная селективность обуславливается конформационным отбором по сайту связывания фермента. (A) Наблюдаемое связывание ингибитора 8R в Положение-1 (8R-P1) принимает конформацию, которая диктуется Положением-1 сайта связывания. В данной конформации расстояние между хиральной метильной группой линкера и метильной группой тиазольного кольца составляет 4,2 Å. (B) Теоретическая модель 8S связывания с той же конформацией, как 8R в Положении-1 (8S-P1), показывает, что гомологическое расстояние уменьшается до 2,5 Å. (C) Наблюдаемое связывание ингибитора 8S в Положение-2 (8S-P2) принимает конформацию, которая диктуется Положением-2 сайта связывания. В данной конформации расстояние между хиральной метильной группой линкера и метильной группой тиазольного кольца составляет 4,4 Å. (D) Теоретическая модель 8R связывания с той же конформацией, как 8S в Положении-2 (8R-P2), показывает, что гомологическое расстояние уменьшается до 2,6 Å. (E) Для 8R-P1, наблюдаемый торсионный угол между тиазольным кольцом и линкером составляет  $-59^\circ$ . Сканирование возможных торсионных углов показывает, что данная величина соответствует низкоэнергетической конформации 8R. (F) Для 8S-P1, наблюдаемый торсионный угол составляет  $189^\circ$ . Данная величина соответствует высокоэнергетической

конформации. (G) Для 8S-P2, наблюдаемое торсионный угол составляет  $-326^\circ$ . Сканирование возможных торсионных углов показывает, что данная величина соответствует низкоэнергетической конформации 8S. (H) Для 8R-P2, наблюдаемое торсионный угол составляет  $147^\circ$ . Данная величина соответствует высокоэнергетической конформации.

**[0015]** Фигура 8. *in vivo* оценка соединения **10**. (A) Количественное определение РЕТ пробы,  $^{18}\text{F}$ -L-FAC, эффективность всасывания в печени C57Bl/6 самок мышей, обработанных соединениями **10** (25 мг/кг) путем внутрибрюшинной инъекции. Доза препарата: 50 % ПЭГ/Трис, pH 7,4. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM для по меньшей мере  $n = 5$  мышь/момент времени. (B) Фармакокинетический профиль соединения **10** в плазме. C57Bl/6 самкам мышей дозировали путем внутрибрюшинной инъекции 50 мг/кг соединения **10**, сформулированного в 50 % ПЭГ/Трис, pH 7,4. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM для  $n = 4$  мышей/момент времени.

**[0016]** Фигура 9 Связывание **Ia** с dCK человека. A) Ленточная диаграмма dCK мономера с наблюдаемой молекулой **Ia**, связанной (кружочки) в активном сайте. Нуклеотид UDP также присутствовал в комплексе. B) Взаимодействия между **Ia** и dCK. dCK остатки, делающие вклад во взаимодействие с **Ia**, (палочки) представлены как палочки. Полярные взаимодействия представлены как пунктирные черные линии.

**[0017]** Фигура 10 Fo-Fc отображение, контурированное при 3 сигма вокруг соединения **2** из протомера A. Соединение **2** было удалено с модели, которую затем подвергали нескольким циклам уточнения для устранения смещения модели. Данный ингибитор связывается как две молекулы в активном сайте dCK в Положении-1 и -2 и обозначается **2-P1** и **2-P2**, соответственно.

**[0018]** Фигура 11 Fo-Fc отображение, контурированное при 2,5 сигма вокруг соединений **3** и **4** из протомера A. A) Соединение **3** было удалено с модели, которую затем подвергали нескольким циклам уточнения для устранения смещения модели. B) Тоже самое для соединения **4**.

**[0019]** Фигура 12 Fo-Fc отображение, контурированное при 2,0 сигма вокруг соединений **5** и **6** из протомера A. A) Соединение **5** было удалено с модели, которую затем подвергали нескольким циклам уточнения для устранения смещения модели. B) Тоже самое для соединения **6**.

**[0020]** Фигура 13 Fo-Fc отображение, контурированное при 2,0 сигма вокруг соединений **7** и **8** из протомера А. А) Соединение **7** было удалено с модели, которую затем подвергали нескольким циклам уточнения для устранения смещения модели. В) Тоже самое для соединения **8**. Данный ингибитор связывает две молекулы в активном сайте dCK. Благодаря присутствию хиральному углероду в линкере и использованию рацемической смеси, мы наблюдаем связывание R энантиомера в Положение-1 (**8R-P1**) и связывание S энантиомера в Положение-2 (**8S-P2**).

**[0021]** Фигура 14 Относительная ориентация **8R** и **8S** колец при dCK связывании. А) **8R** / **8S**, как видно в структуре. В) **8S** накладывается на **8R** исходя из пиримидинового кольца. Обратите внимание на различные относительные ориентации тиазольного и фенильного колец между **8R** и **8S**.

**[0022]** Фигура 15 Относительная ориентация **8R** и **8S**, оптимизированная в растворе, по сравнению с ориентацией **8R**, связанная в Положение 1 в кристаллической структуре. Структуры выравнивают в соответствии с тиазольными кольцами. Это иллюстрирует конформационное изменение, которое должно произойти для молекулы, чтобы выйти из раствора и связаться с белком. Как **8R**, так и **8S** подвергаются потере энергии, подвергаясь данному конформационному изменению, но потеря для **8R** значительно меньше, чем потери для **8S**.

**[0023]** Фигура 16 Реутилизация дезоксицитидина (dC) с помощью dCK предотвращает тимидин (dT)-индуцированный летальный репликационный стресс (RS) в T-ALL клетках. (A) Аллостерический контроль DNP дЦТФ продуцирования dT с помощью dTTP. RNR: рибонуклеотидредуктаза. (B) Эффекты от dT обработки (24 ч) на дЦТФ и dTTP пулы. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM. (C) Анализ СЕМ клеточного цикла после обработки носителем или dT (50 мкМ)  $-/+$  2,5 мкМ dC в течение 24 часов. (D) Анализ СЕМ клеточного цикла после обработки гидроксимочевинной (50 мкМ), 5-фторурацилом (15 мкМ) или цисплатином (1,6 мкМ) в течение 24 часов  $-/+$  2,5 мкМ dC. (E) Анализ типичных иммуноблотов dCK и экспрессии актина и (F) dCK киназы в СЕМ dCK<sup>wt</sup> (скремблированная кшРНК) клетках и dCK<sup>low</sup> (кшРНК против dCK) клетках. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM, \*\*\*  $P < 0,001$  (G) дЦТФ уровни в СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> клетках, обработанных в течение 24 часов носителем или dT (50 мкМ)  $-/+$  dC (2,5 мкМ). Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM, \*\*\*  $P < 0,001$  (H) Анализ клеточного цикла СЕМ dCK<sup>low</sup> клеток, обработанных носителем или

dT (50 мкМ) +/- 2,5 мкМ dC в течение 24 часов. **(I)** Типичные иммуноблоты, детектирующие Chk1, pChk1 (Ser345), Chk2, pChk2 (Thr68), dCK и актин в СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> клетках, обработанных носителем или dT (50 мкМ) в присутствии 2,5 мкМ dC в течение 24, 48 и 72 часов. **(J)** Содержание pH2A.X (Ser139) и ДНК (DAPI) в СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> клетках, обработанных носителем или dT (50 мкМ) в присутствии 2,5 мкМ dC в течение 24 часов. **(K)** Типичные изображения и количественное определение СОМЕТ анализа, который проводили на СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> клетках через 48 часов после обработки носителем или dT (50 мкМ) в присутствии 2,5 мкМ dC. Значения представляют собой средние величины момента хвоста по Оливе ± SEM из 100 клеток на изображение x 4 изображения/группу; *n*=2 независимые эксперименты. \*\*\* *P*<0,001. Накопление: 4x. **(L)** Окрашивание аннексином V СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> клеток после обработки носителем, dC (2,5 мкМ), dT (50 мкМ) или dC + dT в течение 72 часов. Все значения представляют собой средние величины ± SEM от, по меньшей мере, трех повторений/точка данных. \*\*\* *P*<0,001. Все данные на Фиг. 1 являются типичными для *n*=3 независимых экспериментов, если не указано другое.

**[0024]** Фигура 17 Обработка dT запускает метаболический переход на NSP-опосредованный дЦТФ биосинтез в T-ALL клетках и повышающе регулирует NSP **(A)** Схема подхода введения стабильной изотопной метки [U-<sup>13</sup>C]-глюкозы и [U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-дезоксцитидина (dC), которую используют для определения источника (DNP или NSP) из не содержащего дЦТФ пула и дЦТФ, введенного в ДНК СЕМ клеток, обработанных разными концентрациями dT. **(B)** дЦТФ, полученные от [U-<sup>13</sup>C]-глюкозы (DNP) и [U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-dC (NSP) в не содержащем дЦТФ пуле, и введенные в ДНК СЕМ клеток через 12 часов после инкубирования с предшественниками DNP и NSP с введенной стабильной изотопной меткой, в присутствии или в отсутствие dT. Значения представляют собой среднюю величину абсолютной площади пика/10<sup>3</sup> клеток ± SEM, \* *P*< 0,05, \*\* *P*<0,01, \*\*\* *P*<0,001, по сравнению с 0 мкМ dT контроля. Данные являются типичными для *n*=2 независимых экспериментов. **(C)** Количественное определение активности dCK киназы в СЕМ клетках в исходном состоянии и через 8 часов после обработки 50 мкМ dT. Данные являются типичными для *n*=2 независимых экспериментов. Значения представляют собой средние величины ± SEM, \*\*\* *P*<0,001. **(D)** Количественное определение захвата <sup>3</sup>H-меченного дезоксицитидина (dC) СЕМ клетками в исходном состоянии и через 4 часа после обработки 50 мкМ dT. Данные являются типичными для *n*=2 независимых экспериментов. Значения представляют собой средние величины ± SEM, \*\*\* *P*<0,001.

**[0025]** Фигура 18 *in vivo*, реутилизация эндогенного dC освобождает T-ALL клетки от RS, индуцированной dT обработкой. **(А)** *Левая ось:* Уровни dT в плазме у NSG мышей, обработанных dT (2 г/кг; одноразовая доза). Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM от  $n=3$  мышей/момент времени;  $n=2$  независимых экспериментов. *Правая ось:* Концентрации dTTP от СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> опухолей в разные точки времени после обработки одноразовой дозой dT (2 г/кг); значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM,  $n=4$  мышей/момент времени;  $n=2$  независимых эксперимента. **(В)** Типичный иммуноблот ( $n=3$  независимые эксперименты), показывающий уровни pChk1 (Ser345) в разные точки времени в билатеральных с.к. СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> опухолей, имплантированных NSG мышам, обработанным dT (2 г/кг; одноразовая доза). **(С)** Концентрации дЦТФ СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> опухолей в разные точки времени после обработки одноразовой дозой dT (2 г/кг); значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM,  $n=5$  мышей/момент времени;  $n=2$  независимых эксперимента. \*\*\*  $P<0,001$ . **(D)** Схема экспериментального проекта для количественного определения инкорпорирования [U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-dC в ДНК dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> СЕМ опухолей через 4 часа после обработки одноразовой дозой 2 г/кг dT или носителя. **(Е)** Данные ЖХ/МС/МС-МРМ количественного определения инкорпорирования меченного дЦТФ в ДНК. Данные являются средними величинами  $\pm$  SEM  $n=6$  мышей/группа;  $n=2$  независимых эксперимента. \*\*  $P<0,01$ . **(F)** Схема анализа *in vivo* PET активности dCK. **(G)** Захват <sup>18</sup>F-L-FAC в с.к. СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> ксенотрансплантатных опухолей через 4 часа после инъекций носителя или dT. Значения представляют собой средний % снижения <sup>18</sup>F-FAC сигнала относительно dCK<sup>wt</sup> носителя  $\pm$  SEM,  $n=4$  мышей/группа;  $n=2$  независимых эксперимента. \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$ .

**[0026]** Фигура 19 dCK является посредником резистентности к dT в T-ALL клетках *in vivo* **(А)** Последовательные секретлируемые измерения *Gaussia* люциферазы периферической крови у NSG мышей, несущих СЕМ dCK<sup>wt</sup> или dCK<sup>low</sup> с.к. опухолей ( $n=6$  мышей/состояние), которые обрабатывают каждые 12 часа носителем или dT (2 г/кг), начиная с 7-ого дня после имплантации опухоли до 13-ого дня. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM;  $n=2$  независимых эксперимента. \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$  по сравнению с dCK<sup>low</sup> носителем в указанный момент времени **(В)** СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> опухоли от мыши из **(А)**, обработанных носителем или dT. **(С)** Массы опухолей (мг) из **(А)**. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM;  $n=2$  независимых эксперимента. \*\*\*  $P<0,001$ .

**[0027]** Фигура 20 Развитие DI-39, низкомолекулярный ингибитор dCK, который усиливается с ингибированием *de novo* биосинтеза дЦТФ в лейкозных клетках (A) Схема, иллюстрирующая развитие DI-39, начиная со скрининга с высокой пропускной способностью (HTS) библиотеки из 90 000 соединений, который предоставляет начальную дозу DI-0120. Дальнейшее соотношение структура-активность (SAR) дала 80 новых соединений, включая DI-39. (B) Химическая структура DI-39. (C) Измерения ЖХ/МС/МС-МРМ DI-39 в СЕМ клетках подвергали воздействию 1 мкМ лекарственного средства в течение указанных периодов времени. Клетки промывали три раза через 60 минут (обозначено вертикальной линией), и клеточное удержание лекарственного средства измеряли снова через 60 минут. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM (D) Значение IC<sub>50</sub> для DI-39 определяли как % ингибирования захвата <sup>3</sup>H-dC uptake СЕМ клетками. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM (E) 2,1 Å кристаллическая структура dCK со связанным DI-39 и уридин дифосфатом (UDP). (F) Внутриклеточные концентрации дЦТФ в культивированных СЕМ dCK<sup>wt</sup> клетках, обработанных носителем, dT (50 мкМ), DI-39 (1 мкМ) или DI-39 + dT в течение 24 часов. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM; *n*=2 независимых эксперимента. \*\*\* *P*<0,001. (G) Типичные иммуноблоты, детектирование Chk1, pChk1 (Ser345) и актина в СЕМ клетках, обработанных носителем, dT (1 мМ), DI-39 (100 нМ) или DI-39 + dT в присутствии 2,5 мкМ dC в течение 24 часов. (H) Окрашивание аннексином V СЕМ клеток, обработанных в течение 72 часов указанными концентрациями DI-39 и dT в присутствии 2,5 мкМ dC. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM; *n*=2 независимых эксперимента, \*\*\* *P*<0,001 по сравнению с 50 мкМ dT. (I) Окрашивание аннексином V L1210-10 dCK нулевых клеток, обработанных в течение 72 часов указанными концентрациями DI-39. Значения представляют собой средний % положительного окрашивания клеток для аннексина V  $\pm$  SEM; *n*=2 независимых эксперимента. (J). Типичные иммуноблоты Jurkat, MOLT-4, RSR4;11, NALM-6 и TF-1 лейкозных клеток, обработанных носителем, dT (1 мМ), DI-39 (100 нМ) или DI-39 + dT в присутствии 2,5 мкМ dC в течение 24 часов (NALM-6) или в течение 72 часов (Jurkat, MOLT-4, RSR4;11, TF-1). (K) Окрашивание аннексином V той же панели линий лейкозных клеток как в (J), обработанных в течение 72 часов носителем, dT (1 мМ), DI-39 (100 нМ) или DI-39 + dT. Культуры были дополнены 2,5 мкМ dC. Значения представляют собой средний % положительного окрашивания клеток для аннексина V  $\pm$  SEM; *n*=3 независимых эксперимента. \* *P*<0,05, \*\* *P*<0,01, \*\*\* *P*<0,001.

**[0028]** Фигура 21 DI-39 ингибирует dCK активность *in vivo*, как определено по  $^{18}\text{F}$ -FAC PET и способствует RS при комбинировании с dT **(А)** Фармакокинетический профиль DI-39. C57Bl/6 мышам дозировали DI-39 путем внутривенной инъекции. Доза препарата: 10 % ДМСО и 40 % каптисол (SBE- $\beta$ -CD, полианионный переменного замещенный сульфобутиловый простой эфир  $\beta$ -циклодекстрина, (Stella and He, 2008) в воде. Приблизительные значения площади под кривой (AUC), почечный клиренс (CL), время полувыведения ( $T_{1/2}$ ), максимальная концентрация в плазме ( $C_{\text{max}}$ ) и время достижения максимальной концентрации ( $T_{\text{max}}$ ) рассчитывали используя Boomer/Multi-Forte PK функции для Microsoft Excel. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SD,  $n=4$ /точка времени;  $n=2$  независимых эксперимента. **(В)** ЖХ/МС/МС-МРМ количественное определение концентраций DI-39 в плазме и СЕМ опухолях в разные точки времени после обработки. См. способы для деталей. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SD,  $n=4$ /группу. **(С)** Схематическая иллюстрация  $^{18}\text{F}$ -FAC PET/СТ исследования, чтобы определить *in vivo* dCK ингибирование DI-39 в ксенотрансплантатах СЕМ с.к. **(D)** Период действия *in vivo*  $^{18}\text{F}$ -FAC PET/СТ сканирует для определения dCK ингибирования DI-39 (единственная внутривенная инъекция, 50 мг/кг). Значения представляют собой средние % снижения сигнала  $^{18}\text{F}$ -FAC  $\pm$  SD,  $n=4$  мышей/группа;  $n=2$  независимых эксперимента. **(Е)** % инкорпорирования [ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ]-dC в ДНК ксенотрансплантатов СЕМ через 5,5 часов после однократной обработки носителем, DI-39 (50 мг/кг), dT (2 г/кг) или DI-39 + dT; мыши были активированными стабильным изотопно меченным dC в течение 30 минут перед умерщвлением. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM,  $n=4$ /группа;  $n=2$  независимых эксперимента. \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$ . **(F)** Типичные иммуноблоты pChk1 (Ser345), Chk1, и актина в тканях опухоли, собранные у мышей через 6 часов после обработки DI-39 (50 мг/кг), dT (2 г/кг) или обеими агентами;  $n=3$  независимых эксперимента.

**[0029]** Фигура 22 Фармакологическое совместно направленное взаимодействие DNP и NSP дЦТФ продуцирование является эффективным проти T-ALL клеток *in vivo* **(А)** Типичные изображения ксенотрансплантатов СЕМ, выделенные из мышей, обработанных носителем, dT (2 г/кг), DI-39 (50 мг/кг) или DI-39 + dT каждые 12 часов, начиная с 7 дня после инокуляции и продолжая до 14 дня.  $n=6$  мышей/группа;  $n=2$  независимых эксперимента. **(В)** Массы опухолей из **(А)**. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM;  $n=2$  независимых эксперимента,  $n=6$  мышей/группа. \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$ . **(С)** Типичные изображения и количественное определение

окрашивания образцов опухолей из (А). Накопление: 20х. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM.  $n=6$  мышей/группа. \*\*\*  $P<0,001$ . (D) Типичные FACS графики и количественное определение eGFP<sup>+</sup> СЕМ лейкозных клеток в костном мозге у NSG мышей, обработанных носителем, dT (2 г/кг), DI-39 (50 мг/кг) или DI-39 + dT. Мышей ( $n=6$ /группа) обрабатывали каждые 12 часов, начиная с 3 дня после инокуляции с  $1,0 \times 10^6$  СЕМ клетками. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM;  $n=2$  независимых эксперимента. \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$ .

**[0030]** Фигура 23 Фармакологическое совместно направленное взаимодействие DNP и NSP является эффективным против первичных мышинных  $p185^{BCR-ABL} Arf^{-/-}$  Pre-B ALL клеток, принимая во внимание умеренный гематопозитический пул клетки-предшественника (А) Окрашивание аннексином V  $p185^{BCR-ABL} Arf^{-/-}$  пре-В клеток через 48 часов после обработки носителем, dT (200 мкМ), DI-39 (100 нМ), или DI-39 + dT в присутствии 2,5 мкМ dC. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM;  $n=2$  независимых эксперимента. \*\*  $P<0,01$ . (B) Типичные билюминесцентные изображения (BLI) мышей ( $n=6$ /группа), обработанных носителем, dT (2 г/кг), DI-39 (50 мг/кг) или DI-39 + dT на 14 день после внутривенной инъекции  $2,0 \times 10^4$  пре-В лейкозных клеток/мышь. (C) Количественное определение BLI из ВМ и селезенки. \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ . (D) Типичные FACS анализы и количественное определение CD19<sup>+</sup> лейкозных клеток в ВМ обработанных мышей. \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$ . (E) Количественное определение популяций клеточной линии  $Sca-1^+ c-Kit^+$  (LSK) из обработанных мышей. \*\*  $P < 0,01$ . (F) LSK клетки из ВМ обработанных мышей анализировали касательно экспрессии CD34 и Flt3, чтобы идентифицировать и количественно определить долговременную (LT, CD34<sup>+</sup>, Flt3<sup>-</sup>), кратковременную (ST, CD34<sup>+</sup>, Flt3<sup>-</sup>), и полипотентную клетку-предшественник (MPP, CD34<sup>+</sup>, Flt3<sup>+</sup>) стволовых клеток. (G) Измерения массы тела, а также RBC, гемоглобина, тромбоцитов и нейтрофилов (H) от NSG мышей ( $n=6$ /группа), обработанных носителем, dT (2 г/кг), DI-39 (50 мг/кг), или DI-39 + dT каждые 12 часов в течение 7 дней. Данные представляют собой средние величины  $\pm$  SEM. Все данные представлены по меньшей мере двум независимым экспериментам.

**[0031]** Фигура 24 Оценка потенциальной токсичности DI-39/dT комбинированной терапии и модели (А) Типичное FACS окрашивание pH2A.X и данные количественного определения в EryA (CD71<sup>+</sup>/ высокое рассеяние в направлении распространения) эритроблестах, чтобы оценить эндогенный (для  $dCK^{-/-}$  мышей,  $n=4$  мышей/группа) или потенциальный фармакологически-индуцированный (DI-39 + dT) генотоксический стресс.

NSG мышей ( $n=5$  мышей/группа) обрабатывали носителем или комбинацией DI-39 (50 мг/кг) и dT (2 г/кг) каждые 12 часов в течение 8 дней. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM. \*\*  $P<0,01$ . (B) Типичные FACS графики и количественное определение микроядерных эритроцитов, свидетельствующие об эндогенном (для  $dCK^{-/-}$  мышей) или потенциальном фармакологически-индуцированном (DI-39 + dT) генотоксическим стрессом. Значения представляют собой средние величины  $\pm$  SEM из  $n=2$  независимых экспериментов. \*  $P<0,05$ , \*\*\*  $P <0,001$ . (C, D) Предполагается логическое обоснование для объяснения селективности комбинированной терапии для лейкозных клеток по сравнению с нормальными гематopoэтическими клетками-предшественниками (см. текст для деталей).

[0032] Фигура 25 Стратегия FACS пропускания сигналов для идентификации популяций гематopoэтической клетки-предшественника, количественно определяемых на Фиг. 23, E и F.

[0033] Фигура 26. Структуры и значения  $IC_{50}$ , определенные с использованием анализа  $^3H$ -dC захвата в L1210 клетках для начальных HTS доз (1 и 2) и для коммерчески доступных соединений, содержащих подобные структурные остовы (3 - 7).

[0034] Фигура 27. Связывание 15a с dCK человека. (A) Ленточная диаграмма мономера dCK с двумя наблюдаемыми молекулами 15a, связанными (кружочки) в активном сайте. Нуклеотид UDP также присутствовал в комплексе. (B) Взаимодействия между 15a и dCK. Полярные взаимодействия показаны как пунктирные линии. Две фосфатные группы UDP (сверху справа) демонстрируют относительную ориентацию 15a-I и 15a-II к нуклеотиду. (C) Метильная группа 15a-I и 15a-II тиазольного кольца (стрелки) укладываются одна против другой, занимая гидрофобный карман.

[0035] Фигура 28. (A) Полный термодинамический цикл, касающийся энергий связывания с отклонением молекулы A к молекуле B.  $\Delta G_{\text{белка}}(A \rightarrow B)$  обозначает изменение свободной энергии при отклонении A к B в сольватированном комплекса ингибитор-белок, тогда как  $\Delta G_{\text{воды}}(A \rightarrow B)$  обозначает изменение свободной энергии, когда отклонение происходит в только воде. Разница в свободных энергиях связывания,  $\Delta \Delta G_{\text{связывание}}$ , равняется изменению свободной энергии, когда молекула A связывается с белком [ $\Delta G_{\text{связывание}}(A)$ ], которая отнимается от изменения свободной энергии, когда молекула B связывается [ $\Delta G_{\text{связывание}}(B)$ ]. Поскольку сумма всех компонентов в полном термодинамическом цикле должна равняться нулю, поэтому  $\Delta \Delta G_{\text{связывание}}$  также

является эквивалентным  $\Delta G_{\text{белка}}(A \rightarrow B) - \Delta G_{\text{воды}}(A \rightarrow B)$ . (B) Компьютерная модель соединения 15с в комплексе с dCK. Остатки кармана связывания Glu 53, Gln 97, Arg 114, и Asp 133 показаны в явной форме, тогда как, остаток белка иллюстрируется как ленточная структура. (C) Изменения свободной энергии (ккал/моль), ассоциированной с отклонением алкильной цепи в 5-положение тиазола.  $\Delta G_{\text{белка}}$  представляет собой изменение свободной энергии для сольватированного комплекса ингибитор-белок.  $\Delta G_{\text{воды}}$  представляет собой изменение свободной энергии для ингибитора в только воде. Изменение свободной энергии при связывании обозначается как  $\Delta \Delta G_{\text{связывание}}$ .

**[0036]** Фигура 29. Оценка *in vivo* ингибиторов dCK с помощью PET анализа. (A) Схема механизма, по которому  $^{18}\text{F-L-FAC}$  аккумулируется в dCK экспессирующих клетках. (B) Типичные аксиальные изображения  $^{18}\text{F-L-FAC}$  PET/СТ сканы печени C57Bl/6 мышей, обработанных соединениями **15a**, **36** и **37**. (C) Количественное определение  $^{18}\text{F-L-FAC}$  захвата в печени для образца ингибиторов с низкой наномолярной *in vitro* эффективностью. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM для по меньшей мере  $n = 3$  мышей/группа. \*,  $P < 0,03$ . (D) Типичные изображения и количественное определение  $^{18}\text{F-L-FAC}$  PET/СТ сканов CCRF-CEM опухоли, которые несут NSG мыши, которые обрабатывали носителем, или соединением **36**. Данные представлены, как прямоугольный и точечный графики для, по меньшей мере,  $n = 4$  мышей/группа. \*,  $P < 0,0012$ .

**[0037]** Фигура 30. Фармакокинетический профиль соединения **36**. C57Bl/6 самкам мышей дозировали соединение **37** путем внутрибрюшинной инъекции. Доза препарата: 10 % ДМСО и 40 % Каптизол в воде. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SEM для  $n = 4$  мышей/момент времени.

**[0038]** Фигура 31. Кристаллическая структура dCK:36 комплекса. (A) Ленточная диаграмма dCK мономера с единичной наблюдаемой молекулой **36**, связанной (кружочки) в активном сайте. Нуклеотид UDP (кружочки) также присутствовал в комплексе. (B) Подробности взаимодействий между **36** и dCK. dCK остатки включены в полярные и гидрофобные взаимодействия с **36**. Полярные взаимодействия показаны как пунктирные черные линии.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0039]** Сокращения, использованные в данном документе, имеют свое общепринятое значение в химической и биологической областях. Химические структуры и формулы, представленные в данном документе, составлены в соответствии со стандартными правилами химической валентности, известными в химической области.

**[0040]** Там где группы заместителей определяются их общепринятыми химическими формулами, написанными слева направо, они в равной степени охватывают химически идентичные заместители, которые будут получены в результате написания структуры справа налево, например,  $-\text{CH}_2\text{O}-$  эквивалентно  $-\text{OCH}_2-$ .

**[0041]** Термин “алкил,” сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, линейную (т.е., неразветвленную) или разветвленную углеродную цепь (или углерод), или их комбинацию, которая может быть полностью насыщенной, моно- или полиненасыщенной и может включать одно-, двух- и многовалентные радикалы, имеющие определенное количество атомов углерода (т.е.,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  означает от одного до десяти углеродов). Алкил представляет собой нециклизированную цепь. Примеры насыщенных углеводородных радикалов включают, но не ограничиваются этим, группы, такие как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, (циклогексил)метил, гомологи и изомеры, например, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил, и им подобный. Ненасыщенная алкильная группа представляет собой алкильную группу, имеющую одну или больше двойных связей или тройных связей. Примеры ненасыщенных алкильных групп включают, но не ограничиваются этим, винил, 2-пропенил, кротоновую группу, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил, и высшие гомологи и изомеры. Алкокси представляет собой алкил присоединенный к остатку молекулы через кислородный линкер ( $-\text{O}-$ ).

**[0042]** Термин “алкилен,” сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, двухвалентный радикал, полученный из алкила, как иллюстрируется, но не ограничивается этим,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ . Как правило, алкильная (или алкиленовая) группа будет иметь от 1 до 24 атомов углерода, где такие группы, имеющие 10 или меньше атомов углерода, являются предпочтительными в представленном изобретении. “Низший алкил” или “низший алкилен” представляет собой алкильную или алкиленовую группу с более короткой цепью, как правило, имеющую восемь или меньше атомов

углерода. Термин “алкенилен,” сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, двухвалентный радикал полученные из алкена.

**[0043]** Термин “гетероалкил,” сам по себе или в комбинации с другим термином, означает, если не указано иное, стабильную линейную или разветвленную цепь, или их комбинации, включая, по меньшей мере, один атом углерода и, по меньшей мере, один гетероатом, выбранный из группы, состоящей из O, N, P, Si и S, и где атомы азота и серы необязательно могут быть окислены, и гетероатом азота необязательно может быть кватернизированным. Гетероатом(ы) O, N, P, S, B, As и Si могут быть расположены в каком-либо внутреннем положении гетероалкильной группы или в положении, в котором алкильная группа присоединена к остатку молекулы. Гетероалкил представляет собой нециклизированную цепь. Примеры включают, но не ограничиваются этим:  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  и  $-\text{CN}$ . Вплоть до двух или трех гетероатомов могут следовать друг за другом, так как, например,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  и  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ .

**[0044]** Аналогичным образом, термин “гетероалкилен,” сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, двухвалентный радикал, полученный из гетероалкила, как иллюстрируется, но не ограничивается этим,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  и  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ . Для гетероалкиленовых групп, гетероатомы также могут располагаться или на любом из двух или на обоих концах цепи (например, алкиленокси, алкилендиокси, алкиленамино, алкилендиамино, и т.п.). Более того, для алкиленовых и гетероалкиленовых связующих групп, никакая ориентация не предполагается направлением, в котором записывается формула связующей группы. Например, формула  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$  представляет собой как  $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ , так и  $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$ . Как описано выше, гетероалкильные группы, как использовано в данном документе, включают такие группы, которые присоединены к остатку молекулы через гетероатом, такие как  $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{OR}'$ ,  $-\text{SR}'$  и/или  $-\text{SO}_2\text{R}'$ . Там, где описывается “гетероалкил”, с последующими описаниями конкретных гетероалкильных групп, таких как  $-\text{NR}'\text{R}''$  или аналогичных, будет понятно, что термины гетероалкил и  $-\text{NR}'\text{R}''$  не являются повторяющимся или взаимоисключающими. Скорее, конкретные гетероалкильные группы описываются, чтобы добавить ясности. Таким образом, термин “гетероалкил” не следует рассматривать в данном документе как исключаящий конкретные гетероалкильные группы, такие как  $-\text{NR}'\text{R}''$  или подобные.

**[0045]** Термины “циклоалкил” и “гетероциклоалкил,” сами по себе или в комбинации с другими терминами, означают, если не указано иное, циклические варианты “алкила” и “гетероалкила,” соответственно. Циклоалкил и гетероалкил не являются ароматическими. Кроме того, для гетероциклоалкила, гетероатом может занимать положение, в котором гетероцикл присоединяется к остатку молекулы. Примеры циклоалкила включают, но не ограничиваются этим, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил, и аналогичные. Примеры гетероциклоалкила включают, но не ограничиваются этим, 1-(1,2,5,6-тетрагидропиридил), 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-морфолинил, 3-морфолинил, тетрагидрофуран-2-ил, тетрагидрофуран-3-ил, тетрагидротиен-2-ил, тетрагидротиен-3-ил, 1-пиперазинил, 2-пиперазинил, и аналогичные. “Циклоалкилен” и “гетероциклоалкилен,” сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из циклоалкила и гетероциклоалкила, соответственно.

**[0046]** Термины “галo” или “галоген,” сами по себе или как часть другого заместителя, означают, если не указано иное, атом фтора, хлора, брома или йода. Кроме того, термины, такие как “галогеналкил” предназначены для включения моногалогеналкила и полигалогеналкила. Например, термин “галоген(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил” включает, но не ограничивается этим, фторметил, дифторметил, трифторметил, 2,2,2-трифторэтил, 4-хлорбутил, 3-бромпропил, и аналогичные.

**[0047]** Термин “ацил” означает, если не указано иное, -C(O)R, где R представляет собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0048]** Термин “арил” означает, если не указано иное, полиненасыщенный, ароматический, углеводородный заместитель, который может представлять собой одно кольцо или несколько колец (предпочтительно от 1 до 3 колец,) которые анелированы вместе (т.е., анелированный колцевой арил) или связаны ковалентно. Анелированный колцевой арил касается нескольких колец, анелированных вместе, в которых, по меньшей мере, одно из анелированных колец является арильным кольцом. Термин “гетероарил” касается арильных групп (или колец), которые содержат, по меньшей мере, один гетероатом, такой как N, O, или S, где атомы азота и серы необязательно окислены, и

атом(ы) азота необязательно являются кватернизированным(ыми). Таким образом, термин “гетероарил” включает анелированные колцевые гетероарильные группы (т.е., несколько колец, анелированных вместе, где, по меньшей мере, одно из анелированных колец является гетероароматическим кольцом). 5,6-Анелированный кольцевой гетероарилен касается двух колец, анелированных вместе, где одно кольцо имеет 5 членов и другое кольцо имеет 6 членов, и где, по меньшей мере, одно кольцо представляет собой гетероарильное кольцо. Аналогичным образом, 6,6-анелированный кольцевой гетероарилен касается двух колец, анелированных вместе, где одно кольцо имеет 6 членов и другое кольцо имеет 6 членов, и где, по меньшей мере, одно кольцо представляет собой гетероарильное кольцо. И 6,5-анелированный кольцевой гетероарилен касается двух колец, анелированных вместе, где одно кольцо имеет 6 членов и другое кольцо имеет 5 членов, и где, по меньшей мере, одно кольцо представляет собой гетероарильное кольцо. Гетероарильная группа может присоединяться к остатку молекулы через углерод или гетероатом. Неограничивающие примеры арильных и гетероарильных групп включают фенил, нафтил, пирролил, пиразолил, пиридазинил, триазинил, пиримидинил, имидазолил, пиразинил, пуринил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, фурил, тиенил, пиридил, пиримидил, бензотиазолил, бензоксазоил, бензимидазолил, бензофуран, изобензофуранил, индолил, изоиндолил, бензотьюфенил, изохинолил, хиноксалинил, хинолил, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-бифенил, 1-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 3-пиразолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, пиразинил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 2-фенил-4-оксазолил, 5-оксазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, 2-фурил, 3-фурил, 2-тиенил, 3-тиенил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидил, 4-пиримидил, 5-бензотиазолил, пуринил, 2-бензимидазолил, 5-индолил, 1-изохинолил, 5-изохинолил, 2-хиноксалинил, 5-хиноксалинил, 3-хинолил и 6-хинолил. Заместители для каждого из указанных выше арильных и гетероарильных кольцевых систем выбирают из группы приемлемых заместителей, описанных ниже. “Арилен” и “гетероарилен,” сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из арила и гетероарила, соответственно. Заместитель гетероарильной группы может быть –О- связанным с кольцевым гетероатомом азота.

**[0049]** “Анелированный кольцевой арил-гетероциклоалкил” представляет собой арил, анелированный с гетероциклоалкилом. “анелированный кольцевой гетероарил-гетероциклоалкил” представляет собой гетероарил, анелированный с гетероциклоалкилом. “Анелированный кольцевой гетероциклоалкил-циклоалкил”

представляет собой гетероциклоалкил, анелированный с циклоалкилом. “анелированный кольцевой гетероциклоалкил-гетероциклоалкил” представляет собой гетероциклоалкил анелированный с другим гетероциклоалкилом. Анелированный кольцевой арил-гетероциклоалкил, анелированный кольцевой гетероарил-гетероциклоалкил, анелированный кольцевой гетероциклоалкил-циклоалкил или анелированный кольцевой гетероциклоалкил-гетероциклоалкил каждый независимо может быть незамещенным или замещенным одним или больше заместителями, описанными в данном документе. Анелированный кольцевой арил-гетероциклоалкил, анелированный кольцевой гетероарил-гетероциклоалкил, анелированный кольцевой гетероциклоалкил-циклоалкил или анелированный кольцевой гетероциклоалкил-гетероциклоалкил каждый независимо может быть назван в соответствии с размером каждого из анелированных колец. Таким образом, например, 6,5-арил-гетероциклоалкильное анелированное кольцо описывает 6 членный арильный фрагмент, анелированный с 5 членным гетероциклоалкилом. Spirocyclic rings represent two or more rings, where adjacent rings are connected through one atom. Individual rings within the scope of spirocyclic rings can be identical or different. Identical rings in spirocyclic rings can be substituted or unsubstituted and can have distinguishing substituents from other individual rings within the system of spirocyclic rings. Possible substituents for individual rings in spirocyclic rings represent possible substituents for one and the same ring, when there is no part of spirocyclic rings (for example, substituents for cycloalkyl or heterocycloalkyl rings). Spirocyclic rings can be substituted or unsubstituted cycloalkanes, substituted or unsubstituted cycloalkenes, substituted or unsubstituted heterocycloalkanes or substituted or unsubstituted heterocycloalkenes, and individual rings within the scope of spirocyclic ring systems can be any of the previously mentioned list, including all rings of one type (for example, when all rings are substituted heterocycloalkane, where each ring can be one and the same or different substituted heterocycloalkane). When it comes to spirocyclic ring systems, spirocyclic rings mean spirocyclic rings, in which, at the very least, one ring represents a heterocyclic ring, and in which each ring can be a distinguishing ring. When it comes to spirocyclic ring systems, substituted spirocyclic rings mean,

что, по меньшей мере, одно кольцо является замещенным, и каждый заместитель необязательно может быть отличающимся.

**[0050]** Термин “оксо,” как используется в данном документе, означает кислород, который связан с атомом углерода двойной связью.

**[0051]** Каждый из указанных выше терминов (например, “алкил,” “гетероалкил,” “арил,” и “гетероарил”) включает как замещенные, так и незамещенные формы указанного радикала. Предпочтительные заместители для каждого типа радикала представлены ниже.

**[0052]** Заместители для алкильных и гетероалкильных радикалов (включая те группы, что часто именуется как алкилен, алкенил, гетероалкилен, гетероалкенил, алкинил, циклоалкил, гетероциклоалкил, циклоалкенил и гетероциклоалкенил) могут быть одним или больше из разновидности групп, выбранных из, но не ограничивающихся этим,  $-OR'$ ,  $=O$ ,  $=NR'$ ,  $=N-OR'$ ,  $-NR'R''$ ,  $-SR'$ , -галогена,  $-SiR'R''R'''$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)R'$ ,  $-CO_2R'$ ,  $-CONR'R''$ ,  $-OC(O)NR'R''$ ,  $-NR'C(O)R'$ ,  $-NR'-C(O)NR''R'''$ ,  $-NR''C(O)_2R'$ ,  $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$ ,  $-NR-C(NR'R'')=NR''''$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)_2NR'R''$ ,  $-NRSO_2R'$ ,  $-NR'NR''R'''$ ,  $-ONR'R''$ ,  $-NR'C(=O)NR''NR''''R''''$ ,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ,  $-NR'SO_2R'$ ,  $-NR'C(=O)R'$ ,  $-NR'C(O)-OR''$ ,  $-NR'OR''$ , в числовом диапазоне от нуля до  $(2m'+1)$ , где  $m'$  – это общее количество атомов углерода в таком радикале.  $R$ ,  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$  каждый предпочтительно независимо обозначает водород, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил (например, арил, замещенный 1-3 галогенами), замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный алкил, алкокси или тиоалкокси группы или арилалкильные группы. Когда соединение согласно изобретению включает больше, чем одну  $R$  группу, например, каждую из  $R$  групп независимо выбирают, поскольку каждая является  $R'$ ,  $R''$ ,  $R'''$  и  $R''''$  группой, когда присутствует больше, чем одна из данных групп. Когда  $R'$  и  $R''$  присоединены к одному и тому же атому азота, они могут быть объединены с атомом азота с образованием 4-, 5-, 6- или 7-членного кольца. Например,  $-NR'R''$  включает, но не ограничивается этим, 1-пирролидинил и 4-морфолинил. Из приведенного выше обсуждения заместителей, квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что термин “алкил” предназначен для включения групп, включая атомы углерода, связанные с группами другими, чем атом водорода, такими как галогеналкил

(например,  $-\text{CF}_3$  и  $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ ) и ацил (например,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$  и аналогичные).

**[0053]** Аналогичные заместителям, описанным для алкильного радикала, заместители для арильных и гетероарильных групп являются разнообразными и выбранными из, например:  $-\text{OR}'$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{SR}'$ , -галогена,  $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{CONR}'\text{R}''$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{NR}'\text{-C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ ,  $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ ,  $-\text{NR}\text{-C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''''$ ,  $-\text{NR}\text{-C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''''$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{NR}'\text{NR}''\text{R}'''$ ,  $-\text{ONR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NR}'\text{C}=\text{O})\text{NR}''\text{NR}'''\text{R}''''$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{R}'$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{Ph})_2$ , фтор( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )алкокси и фтор( $\text{C}_1\text{-C}_4$ )алкила,  $-\text{NR}'\text{SO}_2\text{R}'$ ,  $-\text{NR}'\text{C}=\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})\text{-OR}''$ ,  $-\text{NR}'\text{OR}''$ , в числовом диапазоне от нуля до общего количества открытых валентностей в ароматической кольцевой системе; и где  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  и  $\text{R}''''$  предпочтительно независимо выбирают из водорода, замещенного или незамещенного алкила, замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного гетероциклоалкила, замещенного или незамещенного арила, и замещенного или незамещенного гетероарила. Когда соединение согласно изобретению включает больше, чем одну  $\text{R}$  группу, например, каждую из  $\text{R}$  группы независимо выбирают, поскольку каждая является  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  и  $\text{R}''''$  группами, когда присутствует больше, чем одна из данных групп.

**[0054]** Заместители для колец (например, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкилена, гетероциклоалкилена, арилена или гетероарилена) могут быть изображены как заместители в кольце, а не на конкретном атоме кольца (которые принято называть плавающим заместителем). В таком случае, заместитель может быть присоединен к какому-либо из атомов кольца (подчиняясь правилам химической валентности) и в случае анелированных колец или спироциклических колец, заместитель, изображенный как связанный с одним членом анелированных колец или спироциклических колец (плавающий заместитель на одном кольце), могут быть заместителем на каком-либо из анелированных колец или спироциклических колец (плавающий заместитель на нескольких кольцах). Когда заместитель присоединяется к кольцу, но не к конкретному атому (плавающий заместитель), и нижний индекс для заместителя представляет собой целое число больше единицы, несколько заместителей могут быть на одном и том же атоме, в одном и том же кольце, на разных атомах, в разных анелированных кольцах, в разных спироциклических кольцах, и каждый заместитель необязательно может быть разным. Когда точка присоединения кольца к остатку

молекулы не ограничивается одним атомом (плавающий заместитель), точка присоединения может быть каким-либо атомом кольца, и в случае анелированного кольца или спироциклического кольца, какой-либо атом какого-либо из анелированных колец или спироциклических колец, одновременно подчиняясь правилам химической валентности. Когда кольцо, анелированные кольца или спироциклические кольца содержат один или больше кольцевых гетероатомов, и кольцо, анелированные кольца, или спироциклические кольца показаны с одним или больше плавающими заместителями (включая, но не ограничиваясь этим, точки присоединения к остатку молекулы), плавающие заместители могут быть связаны с гетероатомами. Когда кольцевые гетероатомы показаны связанными с одним или больше водородами (например, кольцевой азота с двумя связями с кольцевыми атомами и третья связь с водородом) в структуре или формула с плавающим заместителем, где гетероатом связан с плавающим заместителем, будет понятно, что заместитель замещает водород, одновременно подчиняясь правилам химической валентности.

**[0055]** Два или больше заместителей необязательно могут соединяться с образованием арильных, гетероарильных, циклоалкильных или гетероциклоалкильных групп. Такие так называемые образующие кольцо заместители, как правило, хотя необязательно, обнаруживаются присоединенными к циклической базовой структуре. В одном варианте реализации изобретения, образующие кольцо заместители присоединяются к смежным членам базовой структуры. Например, два образующие кольцо заместителя, присоединенные к смежным членам циклической базовой структуры создают анелированную кольцевую структуру. В другом варианте реализации изобретения, образующие кольцо заместители присоединены к одному члену базовой структуры. Например, два образующие кольцо заместителя, присоединенные к одному члену циклической базовой структуры создают спироциклическую структуру. В еще другом варианте реализации изобретения, образующие кольцо заместители присоединены к несмежным членам базовой структуры.

**[0056]** Два заместителя на смежных атомах арильного или гетероарильного кольца необязательно могут образовывать кольцо формулы  $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$ , где T и U независимо представляют собой  $-NR-$ ,  $-O-$ ,  $-CRR'$  или простую связь, и q является целым числом от 0 до 3. Альтернативно, два заместителя на смежных атомах арильного или гетероарильного кольца необязательно могут быть замещены на заместитель формулы  $-A-(CH_2)_r-B-$ , где A и B независимо представляют собой  $-CRR'$ ,  $-O-$ ,  $-NR-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,

$-S(O)_2NR'$ -, или простую связь, и  $g$  является целым числом от 1 до 4. Одна из простых связей нового кольца, таким образом, образованного необязательно может быть замещенной на двойную связь. Альтернативно, два заместителя на смежных атомах арильного или гетероарильного кольца необязательно могут быть замещенными на заместитель формулы  $-(CRR')_s-X'$  ( $C''R''R'''$ ) $_d$ -, где  $s$  и  $d$  независимо представляют собой целые числа от 0 до 3, и  $X'$  представляет собой  $-O$ -,  $-NR'$ -,  $-S$ -,  $-S(O)$ -,  $-S(O)_2$ - или  $-S(O)_2NR'$ -. Заместители  $R$ ,  $R'$ ,  $R''$  и  $R'''$  предпочтительно независимо выбирают из водорода, замещенного или незамещенного алкила, замещенного или незамещенного гетероалкила, замещенного или незамещенного циклоалкила, замещенного или незамещенного гетероциклоалкила, замещенного или незамещенного арила и замещенного или незамещенного гетероарила.

**[0057]** Как используется в данном документе, термины “гетероатом” или “кольцевой гетероатом” предназначены, чтобы включать кислород (O), азот (N), серу (S), фосфор (P), бор (B), мышьяк (As) и кремний (Si).

**[0058]** “Группа заместителя,” как используется в данном документе, означает группу, выбранную из следующих фрагментов:

(A) оксо, галогена,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SO_2Cl$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_4H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC=(O)NHNH_2$ ,  $-NHC=(O)NH_2$ ,  $-NHSO_2H$ ,  $-NHC=(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ , незамещенного алкила, незамещенного гетероалкила, незамещенного циклоалкила, незамещенного гетероциклоалкила, незамещенного арила, незамещенного гетероарила, и

(B) алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила, замещенного, по меньшей мере, одним заместителем, выбранным из:

(i) оксо, галогена,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SO_2Cl$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_4H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC=(O)NHNH_2$ ,  $-NHC=(O)NH_2$ ,  $-NHSO_2H$ ,  $-NHC=(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ , незамещенного алкила, незамещенного гетероалкила, незамещенного циклоалкила, незамещенного гетероциклоалкила, незамещенного арила, незамещенного гетероарила, и

(ii) алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила, замещенного, по меньшей мере, одним заместителем, выбранным из:

(а) оксо, галогена,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SO_2Cl$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_4H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC=(O)NHNH_2$ ,  $-NHC=(O)NH_2$ ,  $-NHSO_2H$ ,  $-NHC=(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ , незамещенного алкила, незамещенного гетероалкила, незамещенного циклоалкила, незамещенного гетероциклоалкила, незамещенного арила, незамещенного гетероарила, и

(б) алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила или гетероарила, замещенного, по меньшей мере, одним заместителем, выбранным из: оксо, галогена,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-SO_2Cl$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_4H$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC=(O)NHNH_2$ ,  $-NHC=(O)NH_2$ ,  $-NHSO_2H$ ,  $-NHC=(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ , незамещенного алкил, незамещенного гетероалкил, незамещенного циклоалкил, незамещенного гетероциклоалкил, незамещенного арил, и незамещенного гетероарил.

**[0059]** “Ограниченный по размеру заместитель” или “ограниченная по размеру группа заместителя,” как используется в данном документе, означает группу, выбранную из всех заместителей, описанных выше для “группы заместителя,” где каждый замещенный или незамещенный алкил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_{20}$ алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2 - 20 членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_3-C_8$ циклоалкил, и каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.

**[0060]** “Низший заместитель” или “группа низшего заместителя,” как используется в данном документе, означает группу, выбранную из всех заместителей, описанный выше для “группы заместителя,” где каждый замещенный или незамещенный алкил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_8$ алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2 - 8 членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_3-C_7$ циклоалкил, и каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3 - 7 членный гетероциклоалкил.

**[0061]** В некоторых вариантах реализации изобретения, каждая группа заместителя, описанная в соединениях в данном документе, является замещенной, по меньшей мере, одной группой заместителя. Более конкретно, в некоторых вариантах реализации изобретения, каждый замещенный алкил, замещенный гетероалкил, замещенный циклоалкил, замещенный гетероциклоалкил, замещенный арил, замещенный гетероарил, замещенный алкилен, замещенный гетероалкилен, замещенный циклоалкилен, замещенный гетероциклоалкилен, замещенный арилен и/или замещенный гетероарилен, описанный в соединениях в данном документе, является замещенным, по меньшей мере, одной группой заместителя. В других вариантах реализации изобретения, по меньшей мере, одна или все из данных групп являются замещенными, по меньшей мере, одной ограниченной по размеру группой заместителя. В других вариантах реализации изобретения, по меньшей мере, одна или все из данных групп являются замещенными, по меньшей мере, одной группой низшего заместителя.

**[0062]** В других вариантах реализации изобретения соединений в данном документе, каждый замещенный или незамещенный алкил может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1$ - $C_{20}$ алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2 - 20 членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_3$ - $C_8$  циклоалкил, и/или каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах реализации изобретения соединений в данном документе, каждый замещенный или незамещенный алкилен представляет собой замещенный или незамещенный  $C_1$ - $C_{20}$ алкилен, каждый замещенный или незамещенный гетероалкилен представляет собой замещенный или незамещенный 2 - 20 членный гетероалкилен, каждый замещенный или незамещенный циклоалкилен представляет собой замещенный или незамещенный  $C_3$ - $C_8$ циклоалкилен, и/или каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен представляет собой замещенный или незамещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкилен.

**[0063]** В некоторых вариантах реализации изобретения, каждый замещенный или незамещенный алкил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_1$ - $C_8$ алкил, каждый замещенный или незамещенный гетероалкил представляет собой замещенный или незамещенный 2 - 8 членный гетероалкил, каждый замещенный или незамещенный циклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный  $C_3$ - $C_7$ циклоалкил, и/или

каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкил представляет собой замещенный или незамещенный 3 - 7 членный гетероциклоалкил. В некоторых вариантах реализации изобретения, каждый замещенный или незамещенный алкилен представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>алкилен, каждый замещенный или незамещенный гетероалкилен представляет собой замещенный или незамещенный 2 - 8 членный гетероалкилен, каждый замещенный или незамещенный циклоалкилен представляет собой замещенный или незамещенный C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкилен, и/или каждый замещенный или незамещенный гетероциклоалкилен представляет собой замещенный или незамещенный 3 - 7 членный гетероциклоалкилен.

**[0064]** Некоторые соединения, описанные в данном документе, имеют ассиметричные атомы углерода (оптические или хиральные центры) или двойные связи; энантимеры, рацематы, диастереомеры, таутомеры, геометрические изомеры, стереоизометные формы, которые могут быть определены, с точки зрения абсолютной стереохимии, как (*R*)- или (*S*)- или, как (*D*)- или (*L*)- для аминокислот, и индивидуальные изомеры охватываются объемом настоящего изобретения. Соединения согласно настоящему изобретению не включают, те, которые, как известно в данной области, являются очень нестабильными при синтезе и/или выделении. Настоящее изобретение предназначено для включения соединений в рацемической и оптически чистой формах. Оптически активные (*R*)- и (*S*)-, или (*D*)- и (*L*)-изомеры могут быть получены, используя хиральные синтоны или хиральные реагенты, или получены, используя общепринятые способы. Когда соединения, описанные в данном документе, содержат олефиновые связи или другие центры геометрической асимметрии, и, если не указано иное, предполагается, что соединения включают как *E*, так и *Z* геометрические изомеры.

**[0065]** Как используется в данном документе, термин “изомеры” касается соединений, имеющих одинаковое количество и вид атомов, и, следовательно, одинаковую молекулярную массу, но различающиеся, если речь идет о структурном расположении или конфигурации атомов.

**[0066]** Термин “таутомер,” как используется в данном документе, касается одного из двух или больше структурных изомеров, которые существуют в равновесии, и которые легко превращаются из одной изомерной формы в другую.

**[0067]** Квалифицированному специалисту в данной области будет очевидно, что определенные соединения, согласно данному изобретению, могут существовать в

таутомерных формах, где все такие таутомерные формы соединений находятся в пределах области изобретения.

**[0068]** Если не указано иное, структуры, изображенные в данном документе, также предназначены, чтобы включать все стереохимические формы структуры; т.е., (*R*) и (*S*) конфигурации для каждого асимметричного центра. Таким образом, единичные стереохимические изомеры, а также энантиомерные и диастереомерные смеси представленных соединений, как правило, идентифицированы как стабильные квалифицированным специалистом в данной области, находятся в пределах области изобретения.

**[0069]** Если не указано иное, структуры, изображенные в данном документе, также предназначены, чтобы включать соединения, которые отличаются только присутствием одного или больше изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие представленные структуры, за исключение случаев замещения водорода на дейтерий или тритий, замещения фторида на  $^{18}\text{F}$ , или замещения углерода на  $^{13}\text{C}$ - или  $^{14}\text{C}$ -обогащенный углерод, находятся в пределах области изобретения.

**[0070]** Соединения согласно настоящему изобретению также могут содержать неестественные количественные соотношения атомных изотопов в одном или больше из атомов, что составляют такие соединения. Например, соединения могут быть мечеными радиоактивными изотопами, такими как, например, тритий ( $^3\text{H}$ ), фторид ( $^{18}\text{F}$ ), йод-125 ( $^{125}\text{I}$ ), или углерод-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Все изотопные вариации соединений согласно настоящему изобретению, или радиоактивные или нет, охватываются пределами объема настоящего изобретения.

**[0071]** Символ “” указывает точку присоединения химического фрагмента к остатку молекулы или химической формулы.

**[0072]** Когда фрагмент является замещенным R заместителем, группа может называться как “R-замещенный.” Когда фрагмент является R-замещенным, фрагмент является замещенным, по меньшей мере, одним R заместителем, и каждый R заместитель является необязательно разным. Когда конкретная R группа присутствует в описании химического рода (такого как Формула (I)), римский десятичный разделитель могут использовать для распознавания каждого вида данной конкретной R группы. Например, когда присутствует несколько  $\text{R}^{13}$  заместителей, каждый  $\text{R}^{13}$  заместитель могут распознавать как  $\text{R}^{13,1}$ ,  $\text{R}^{13,2}$ ,

$R^{13,3}$ ,  $R^{13,4}$ , т.д., где каждый из  $R^{13,1}$ ,  $R^{13,2}$ ,  $R^{13,3}$ ,  $R^{13,4}$ , т.д. определен в пределах объема определений  $R^{13}$  и необязательно иначе.

**[0073]** Описание соединений настоящего изобретения ограничивается принципами химической связи, известными квалифицированным специалистам в данной области. Соответственно, когда группа может быть замещенной одним или больше из числа заместителей, такие замещения выбирают таким образом, чтобы удовлетворять принципам химической связи и давать соединения, которые по своему определению не являются нестабильными и/или квалифицированному специалисту в данной области должно быть известно, что вероятно являются нестабильными в условиях окружающей среды, таких как водные, нейтральные и некоторые известные физиологические условия. Например, гетероциклоалкил или гетероарил присоединяется к остатку молекулы через кольцевой гетероатом в соответствии с принципами химической связи, известными квалифицированному специалисту в данной области, тем самым избегая по определению нестабильных соединений.

**[0074]** "Аналог" или "аналоги" используют в соответствии с ясным обычным значением в химии и биологии и относятся к химическому соединению, которое является структурно подобным другому соединению (т.е., так называемому "базовому" соединению), но отличается по составу, например, замещением одного атома на атом другого элемента, или присутствием конкретной функциональной группы, или замещением одной функциональной группы на другую функциональную группу, или абсолютной стереохимией одного или больше хиральных центров базового соединения. Соответственно, аналог представляет собой соединение, которое является аналогичным или сравнимым по функциям и виду, но не по структуре или происхождению к базовому соединению.

**[0075]** Термины "дезокситидинкиназа," "dCK," и "dCK" используются в данном документе взаимозаменяемо и в соответствии с их общим, обычным значением и касается белков одинаковых или подобных названий и функциональных фрагментов и их гомологов. Термин включает какую-либо рекомбинантную или встречающуюся в природе форму dCK (NP000779,1 GI:4503269), или их варианты, которые сохраняют dCK активность (например, в пределах, по меньшей мере, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % или 100 % активности, по сравнению с dCK).

**[0076]** Термин “фармацевтически приемлемые соли” предназначен для включения солей активных соединений, которые получают с относительно нетоксических кислот или оснований, в зависимости от конкретных заместителей, найденных в соединениях, описанных в данном документе. Когда соединения согласно настоящему изобретению содержат относительно кислотные функциональности, основные соли присоединения могут быть получены путем контактирования нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством нужного основания, или в чистом виде, или в приемлемом инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых основных солей присоединения включают соли натрия, калия, кальция, аммония, органического амина, или магния, или подобную соль. Когда соединения согласно настоящему изобретению содержат относительно основные функциональности, кислотные соли присоединения могут быть получены путем контактирования нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством нужной кислоты, или в чистом виде, или в приемлемом инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых кислотных солей присоединения включают те, которые получены из неорганических кислот, таких как соляная, бромистоводородная, азотная, угольная, моногидрокарбонатная, фосфорная, моногидрофосфатная, дигидрофосфатная, серная, моногидросульфатная, йодистоводородная или фосфористая кислота и аналогичные, а также соли, полученные из относительно нетоксичных органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, изомасляная, малеиновая, малоновая, бензойная, янтарная, пробковую, фумаровая, молочная, миндальная, фталевая, бензолсульфоновая, п-толуолсульфоновая, лимонная, винная, щавелевая, метансульфоновая, и аналогичные. Также включенными являются соли аминокислот, такие как аргинат и аналогичные, и соли органических кислот, таких как глюкуроновая или галактуроновая кислота и аналогичные (см., например, Berge *et al.*, “Pharmaceutical Salts”, *Journal of Pharmaceutical Science*, **1977**, 66, 1-19). Некоторые конкретные соединения согласно настоящему изобретению содержат как основные, так и кислотные функциональности, что позволяет соединениям быть превращенными в или основные, или кислотные соли присоединения.

**[0077]** Таким образом, соединения согласно настоящему изобретению могут существовать как соли, такие как с фармацевтически приемлемыми кислотами. Настоящее изобретение включает такие соли. Примеры таких солей включают гидрохлориды, гидробромиды, сульфаты, метансульфонаты, нитраты, малеаты, ацетаты, цитраты, фумараты, тартраты (например, (+)-тартраты, (-)-тартраты, или их смеси, включая

рацемические смеси), сукцинаты, бензоаты, и соли с аминокислотами, такими как глутаминовая кислота. Данные соли могут быть получены по способам, известным квалифицированным специалистам в данной области.

**[0078]** Нейтральные формы соединений предпочтительно воспроизводятся путем контактирования соли с основанием или кислотой и выделения исходного соединения традиционным способом. Исходная форма соединения отличается от разных солевых форм с определенными физическими свойствами, такими как растворимость в полярных растворителях.

**[0079]** В дополнение к солевым формам, настоящее изобретение предусматривает соединения, которые находятся в форме пролекарства. Пролекарства соединений, описанные в данном документе, включают такие соединения, которые легко претерпевают химические или ферментативные изменения в физиологических условиях, давая соединения согласно настоящему изобретению. Кроме того, пролекарства могут превращаться в соединения согласно настоящему изобретению химическими или биохимическими способами в *ex vivo* среде. Например, пролекарства могут медленно превращаться в соединения согласно настоящему изобретению, когда расположены в емкости трансдермального пластыря с приемлемым ферментом или химическим реагентом.

**[0080]** Определенные соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в несольватированных формах, а также в сольватированных формах, включая гидратированные формы. В общем, сольватированные формы эквивалентны несольватированным формам и охватываются объемом настоящего изобретения. Определенные соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в нескольких кристаллических или аморфных формах. В общем, все физические формы эквивалентны для использований, рассматриваемых настоящим изобретением, и предназначены, чтобы быть в пределах объема настоящего изобретения.

**[0081]** Как используется в данном документе, термин “соль” касается кислотных или основных солей соединений, используемых в способах согласно настоящему изобретению. Иллюстративные примеры приемлемых солей представляют собой соли минеральных кислот (соляной кислоты, бромистоводородной кислоты, фосфорной кислоты и аналогичных), соли органических кислот (уксусной кислоты, пропионовой

кислоты, глутаминовой кислоты, лимонной кислоты и аналогичных), соли четвертичного аммония (метилйодид, этилйодид и аналогичные).

**[0082]** Термины “лечащий” или “лечение” касаются каких-либо признаков успеха в лечении или облегчении травмы, болезни, патологии или состояния, включая какой-либо объективный или субъективный параметр, такой как уменьшение симптомов; ремиссия; ослабления симптомов или делаая травмы, патологии или состояния более терпимыми для пациента; замедление скорости дегенерации или ухудшения; делаая конечную точку дегенерации менее тяжело переносимой; или улучшая физическое или психическое самочувствие пациента. Лечение или облегчение симптомов могут быть основаны на объективных или субъективных параметрах, включая результаты физического осмотра, психоневрологических обследований и/или психиатрической экспертизы. Термин “лечение” и связанные с ним действия, включают предотвращение травмы, патологии, состояния или заболевания.

**[0083]** “Эффективное количество” означает количество, достаточное для достижения поставленной цели (например, достижения эффекта, для которого оно вводится, лечения заболевания, снижения активности фермента, усиления активности ферментов, уменьшения одного или более симптомов заболевания или состояния). Пример “эффективного количества” означает количество, достаточное чтобы внести свой вклад в лечение, профилактику или уменьшение симптома или симптомов заболевания, которое также может быть названо как “терапевтически эффективное количество”. “Уменьшение” симптома или симптомов (и грамматические эквиваленты данной фразы) означает снижение тяжести или частоты симптома(ов), или устранение симптома(ов). “Профилактически эффективное количество” лекарственного средства означает количество лекарственного средства, которое при введении субъекту будут иметь предполагаемый профилактический эффект, например, предупреждение или задержка возникновения (или рецидива) травмы, заболевания, патологии или состояния, или снижения вероятности возникновения (или рецидива) травмы, заболевания, патологии или состояния, или их симптомов. Полный профилактический эффект не обязательно происходит при введении одной дозы, и может иметь место только после введения серии доз. Таким образом, профилактически эффективное количество могут вводить в один или больше приемов. Точные количества будут зависеть от цели лечения и будет устанавливаться квалифицированным специалистом в данной области, используя известные методики (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3,

1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

**[0084]** Для каких-либо соединений, описанных в данном документе, терапевтически эффективное количество первоначально может быть определено из анализов клеточной культуры. Целевые концентрации будут такими концентрациями активного(ых) соединения(ий), с которыми существует способность достижения способов, описанных в данном документе, как измерено с использованием способов, описанных в данном документе или известных в данной области.

**[0085]** Как хорошо известно в данной области, терапевтически эффективные количества для использования у людей также могут быть определены из моделей на животных. Например, доза для людей может быть сформулирована для достижения концентрации, которая, как найдено, является эффективной у животных. Дозировку для людей могут регулировать путем мониторинга эффективности соединений, и регулирование дозы в сторону повышения или в сторону понижения, как описано выше. Регулирование дозы для достижения максимальной эффективности у людей на основании способов, описанных выше, и другие способы находятся в значительной степени в пределах возможностей обычного квалифицированного специалиста.

**[0086]** Дозы могут варьировать в зависимости от потребностей пациента и того, какое соединение применяют. Доза, вводимая пациенту, в контексте настоящего изобретения должна быть достаточной для реализации изобретения благоприятного терапевтического ответа у пациента с течением времени. Размер дозы также будет определяться существованием, природой и степенью каких-либо неблагоприятных побочных эффектов. Определение соответствующей дозы для конкретной ситуации находится в компетенции практикующего врача. Как правило, лечение начинают с меньших доз, которые меньше, чем оптимальная доза соединения. Впоследствии, дозу увеличивают небольшими шагами пока не будет достигнут оптимальный эффект при определенных обстоятельствах.

**[0087]** Количества и интервалы дозирования могут регулироваться индивидуально, чтобы обеспечить уровни вводимого соединения, эффективные для конкретных клинических показаний, которые лечат. Это будет обеспечивать терапевтический режим, который является соответствующим тяжести болезненного состояния индивидуума.

**[0088]** Применение принципов, представленных в данном документе, эффективный профилактический или терапевтический режим лечения может планироваться таким образом, что не вызывает существенной токсичности, и еще является эффективным для лечения клинических симптомов, которые демонстрируются конкретным пациентом. Данное планирование должно включать тщательный выбор активного соединения, принимая во внимание факторы, такие как эффективность соединения, относительная биодоступность, масса тела пациента, наличие и тяжесть нежелательных побочных эффектов, предпочтительный способ введения и профиль токсичности выбранного агента.

**[0089]** “Контроль” или “контрольный эксперимент” используется в соответствии с его обычным стандартным значением и касается эксперимента, в котором субъекты или реагенты эксперимента обрабатывают как в параллельном эксперименте, за исключением опущения процедуры, реагента или переменной эксперимента. В некоторых случаях, контроль используют как стандарт сравнения при оценке экспериментальных эффектов. В вариантах реализации изобретения, контроль является измерением активности белка в отсутствие соединения, которое описано в данном документе (включая варианты реализации изобретения и примеры).

**[0090]** “Контактирование” используется в соответствии с его обычным стандартным значением и касается процесса, позволяющего по меньшей мере двум различным видам (например, химическим соединениям, включая биомолекулы или клетки) стать достаточно близкими, чтобы реагировать, взаимодействовать или физически соприкоснуться. Следует иметь в виду; однако, что полученный в результате продукт реакции может быть получен непосредственно по реакции между добавленными реагентами или из промежуточного соединения из одного или больше добавленных реагентов, которые могут быть получены в реакционной смеси.

**[0091]** Термин “контактирование” может включать предоставление двух видов, чтобы реагировать, взаимодействовать или физически соприкоснуться, где два вида могут представлять собой соединение, которое описано в данном документе, и белок или фермент. Контактирование может включать предоставление соединения, описанного в данном документе, чтобы взаимодействовать с белком или ферментом, который участвует в пути передачи сигнала.

**[0092]** Как определено в данном документе, термин “ингибирование”, “ингибировать”, “ингибирующий” и аналогичные в применении к взаимодействию белок-ингибитор

означает негативно влияющий (например, снижающий) на активность или функцию белка по сравнению с активностью или функцией белка в отсутствие ингибитора. Ингибирование может касаться уменьшения заболевания или симптомов заболевания. Ингибирование может касаться уменьшения активности конкретного белка или нуклеиновой кислоты-мишени. Белок может быть дезоксицитидинкиназой. Таким образом, ингибирование включает по меньшей мере, в некоторой мере, частичное или общее блокирование стимуляции, уменьшения, предотвращения или задержки активации, или инактивирование, десенсибилизирование или понижающее регулирование сигнальной трансдукции или ферментной активности или количества белка.

**[0093]** Термин “модулятор” касается композиции, что увеличивает или уменьшает уровень молекулы-мишени, или функции молекулы-мишени, или физическое состояние молекулы-мишени.

**[0094]** Термин “модулировать” используется в соответствии с его обычным стандартным значением и касается действия изменения или варьирования одного или больше свойств. “Модулирование” касается процесса изменения или варьирования одного или больше свойств. Например, модулятор белка-мишени изменяется путем увеличения или уменьшения свойства или функции молекулы-мишени, или количества молекулы-мишени. Модулятор заболевания снижает симптом, причину или характеристику целевого заболевания.

**[0095]** “Селективный” или “селективность” или подобное соединения касается способности соединения делать различия между молекулярными мишенями. “Специфический”, “специфически”, “специфичность”, или подобное соединения касается способности соединения вызывать определенное действие, такое как ингибирование, к конкретной молекулярной мишени с минимальным действием или без действия на другие белки в клетке.

**[0096]** “Фармацевтически приемлемый эксципиент” и “фармацевтически приемлемый носитель” касаются вещества, которое помогает введению активного агента и абсорбции субъектом, и могут быть включенными в композиции настоящего изобретения не вызывая значительного вредного токсикологического эффекта на пациента. Не ограничивающие примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов включают воду, NaCl, нормальные солевые растворы, раствор Рингера с лактатом, нормальную сахарозу, нормальную глюкозу, связующие вещества, наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества,

покрывающие вещества, подсластители, ароматизаторы, растворы солей (такие как раствор Рингера), спирты, масла, желатины, углеводы, такие как лактоза, амилоза или крахмал, сложные эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидин и красители, и т.п. Такие препараты могут быть стерилизованными и, если необходимо, смешаны со вспомогательными агентами, такими как смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, увлажняющие агенты, эмульгаторы, соли влияющие на осмотическое давление, буферы, красители и/или ароматические вещества и аналогичные, которые пагубно не реагируют с соединениями согласно изобретению. Квалифицированному специалисту в данной области будет понятно, что другие фармацевтические эксципиенты являются полезными в настоящем изобретении.

**[0097]** Термин "препарат" предназначен, чтобы включать композицию активного соединения с инкапсулирующим материалом как носителем, обеспечивающим капсулу, в которой активный компонент с или без других носителей, окружен носителем, который, таким образом, находится в соединении с ним. Аналогичным образом, саше и пастилки являются включенными. Таблетки, порошки, капсулы, пилюли, саше и пастилки могут быть использованы как твердые дозированные формы, приемлемые для перорально введения.

**[0098]** Как используется в данном документе, термин "введение" означает пероральное введение, введение в виде суппозитории, местный контакт, внутривенное, парентеральное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутриочаговое, интратекальное, интраназальное или подкожное введение, или имплантацию устройства замедленного высвобождения, *например*, мини-осмотического насоса, субъекту. Введение является каким-либо путем, включая парентеральное и трансмукозальное (например, буккальное, сублингвальное, палатальное, десенное, назальное, вагинальное, ректальное или трансдермальное). Парентеральное введение включает, например, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, внутрикожное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрижелудочковое и внутричерепное. Другие способы доставки включают, но не ограничиваются этим, использование липосомальных препаратов, внутривенной инфузии, трансдермальных пластырей, и т.д.

**[0099]** Композиции, раскрытые в данном документе, могут доставляться трансдермально, местным путем, сформулированные в виде аппликаторов-палочек, растворов, суспензий, эмульсий, гелей, кремов, мазей, паст, желе, лекарственных веществ

в вязком носителе, порошков и аэрозолей. Пероральные препараты включают таблетки, пилюли, порошок, драже, капсулы, жидкости, пастилки, саше, гели, сиропы, взвеси, суспензии, и т.д., приемлемые для приема внутрь пациентом. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, саше, суппозитории и диспергируемые гранулы. Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например, водные растворы или растворы вода/пропиленгликоль. Композиции настоящего изобретения, кроме того, могут включать компоненты, чтобы обеспечить замедленное высвобождение и/или поддержку. Такие компоненты включают высокомолекулярных, анионных мукомиметических полимеров, желирующие полисахариды и мелкодисперсные субстраты носителя лекарственного средства. Данные компоненты обсуждаются более подробно в патентах США № 4911920; 5403841; 5212162; и 4861760. Полное содержание этих патентов включено в данный документ в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей. Композиции, раскрытые в данном документе, также могут быть доставлены в виде микросфер для медленного высвобождения в организме. Например, микросферы могут вводить путем внутрикожных инъекций микросфер, содержащих лекарственное средство, которые медленно высвобождаются подкожно (см. Rao, *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* 7:623-645, 1995; в виде биоразлагаемых и инъекционных гелевых препаратов (см., например, Gao *Pharm. Res.* 12:857-863, 1995); или, в виде микросфер для перорального введения (см., например, Eyles, *J. Pharm. Pharmacol.* 49:669-674, 1997). В другом варианте реализации изобретения, препараты композиций согласно настоящему изобретению могут быть доставлены путем использования липосом, которые сливаются с клеточной мембраной или являются эндоцитозированными, т.е., путем использования рецепторных лигандов, присоединенных к липосоме, которые связываются с поверхностными мембранными белковыми рецепторами клетки, что в результате приводит к эндоцитозу. Путем использования липосом, в частности, когда липосомная поверхность несет рецепторные лиганды, специфические для клеток-мишеней, или иным образом преимущественно направлены на конкретный орган, липосомы могут фокусировать доставку композиций согласно настоящему изобретению в клетки-мишени *in vivo*. (см., например, Al-Muhammed, *J. Microencapsul.* 13:293-306, 1996; Chonn, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:698-708, 1995; Ostro, *Am. J. Hosp. Pharm.* 46:1576-1587, 1989). Композиции также могут быть доставлены в виде наночастиц.

**[0100]** Фармацевтические композиции могут включать композиции, в которых активный ингредиент (например, соединения, описанные в данном документе, включая варианты

реализации изобретения или примеры) содержится в терапевтически эффективном количестве, *т.е.*, в количестве эффективном для достижения поставленной цели. Фактическое количество, эффективное для конкретного применения будет зависеть, в том числе, от состояния, подлежащего лечению. При введении в способах лечения заболевания, такие композиции будут содержать количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого результата, например, модулирования активности молекулы-мишени, и/или уменьшения, устранения или замедления прогрессирования симптомов заболевания.

**[0101]** Дозировка и частота (одна или нескольких доз), вводимая млекопитающему, может варьировать в зависимости от множества факторов, например, страдает ли млекопитающее от другого заболевания, и от его пути введения; размера, возраста, пола, состояния здоровья, массы тела, индекса массы тела и диеты реципиента; природы и степени выраженности симптомов заболевания, подлежащего лечению, вида сопутствующего лечения, осложнений от заболевания, подлежащего лечению или других проблем, связанных со здоровьем. Другие терапевтические схемы лечения или агенты могут быть использованы в сочетании со способами и соединениями, заявляемыми изобретением. Регулирование и манипуляция установленных дозировок (например, частота и продолжительность) вполне находятся в пределах способности квалифицированного специалиста в данной области.

**[0102]** Соединения, описанные в данном документе, могут быть использованы в комбинации друг с другом, с другими активными лекарственными средствами, которые, как известно, являются полезными в лечении заболевания (например противораковые лекарственные средства) или со вспомогательными агентами, которые не могут быть эффективными сами по себе, но могут вносить вклад в эффективность активного агента. Таким образом, соединения, описанные в данном документе, могут вводиться совместно друг с другом или с другими активными лекарственными средствами, которые, как известно, являются полезными в лечении заболевания.

**[0103]** Под термином "совместное введение" подразумевается, что соединение, описанное в данном описании, вводят в то же время, как раз перед, или сразу после введения одного или более дополнительных средств терапий, например, противоракового агента, которые описаны в данном документе. Соединения, описанные в данном документе, могут быть введены сами по себе или могут быть совместно введены

пациенту. Совместное введение означает включение одновременного или последовательного введения соединения индивидуально или в комбинации (более одного соединения или агента). Таким образом, препараты также могут быть объединены, если это желательно, с другими активными веществами (например, противораковыми агентами).

**[0104]** Совместное введение включает введение одного активного агента (например, комплекса, описанного в данном документе) в пределах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 или 24 часов второго активного агента (например, противораковых агентов). Кроме того, рассматриваемыми в данном документе являются варианты реализации изобретения, в которых совместное введение включает введение одного активного агента в пределах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 или 24 часов второго активного агента. Совместное введение включает введение двух активных агентов одновременно, приблизительно одновременно (например, в пределах приблизительно 1, 5, 10, 15, 20 или 30 минут друг от друга), или последовательно в каком-либо порядке. Совместное введение может быть достигнуто путем совместной формуляции, т.е., приготовления одной фармацевтической композиции, включая оба активных агента. В других вариантах реализации изобретения, активные агенты могут быть сформулированы отдельно. Активные и/или вспомогательные агенты могут быть связаны или конъюгированы друг с другом. Соединения, описанные в данном документе, могут быть скомбинированы для лечения рака, такого как химиотерапия или лучевая терапия.

**[0105]** Термин “связанный” или “связанный с” в контексте вещества или активности или функции вещества, связанных с заболеванием, означает, что заболевание вызывается (полностью или частично), симптом заболевания вызывается (полностью или частично) веществом или активностью или функцией вещества, или побочный эффект соединения (например, токсичность) вызывается (полностью или частично) веществом или активностью или функцией вещества.

**[0106]** “Пациент,” “субъект,” “пациент, который в этом нуждается,” и “субъект, который в этом нуждается” в данном документе используются взаимозаменяемо и касается живого организма, страдающего от или склонного к заболеванию или состоянию, которое могут лечить введением фармацевтической композиции, как представлено в данном документе. Не ограничивающие примеры включают людей, других млекопитающих, жвачных животных, крыс, мышей, собак, обезьян, коз, овец, коров, оленей и других животных, не

относящихся к млекопитающим. В некоторых вариантах реализации изобретения пациент является человеком. “Раковый пациент” является пациентом, страдающим от или склонным к развитию рака.

**[0107]** “Заболевание” или “состояние” касается состояния существования или состояния здоровья пациента или субъекта, которое способно подвергаться лечению соединениями или способами, представленными в данном документе. Заболевание, как используется в данном документе, может относиться к раку.

**[0108]** Как используется в данном документе, термин "рак" касается всех типов рака, новообразований или злокачественных или доброкачественных опухолей, обнаруженных у млекопитающих, включая лейкоз, карциномы и саркомы. Типичные виды рака включают острый миелоидный лейкоз (“AML”), хронический миелобластный лейкоз (“CML”), и рак головного мозга, молочной железы, поджелудочной железы, толстой кишки, печени, почек, легких, немелкоклеточный рак легких, меланому, рак яичников, саркому и рак предстательной железы. Дополнительные примеры включают, виды рака шейки матки, виды рака желудка, виды рака головы и шеи, виды рака матки, мезотелиому, метастатический рак кости, медуллобластому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, нейробластому, рак яичников, рабдомиосаркому, первичный тромбоцитоз, первичную макроглобулинемию, первичные опухоли головного мозга, рак, злокачественную поджелудочную инсулиному, злокачественный карциноид, рак мочевого пузыря, пред-злокачественные поражения кожи, тестикулярный рак, лимфомы, рак щитовидной железы, нейробластому, рак пищевода, рак мочеполового тракта, злокачественную гиперкальциемию, рак эндометрия, рак коры надпочечников и новообразования эндокринной и экзокринной поджелудочной железы.

**[0109]** Термин "лейкоз" широко относится к прогрессивным, злокачественным заболеваниям кроветворных органов и, как правило, характеризуется искаженной пролиферацией и развитием лейкоцитов и их предшественников в крови и костном мозге. Лейкоз, как правило, клинически классифицируют на основании (1) длительности и характера заболевания - острый или хронический; (2) типа участвующих клеток; миелоидный (миелогенный), лимфоидный (лимфогенный), или моноцитарный; и (3) увеличение или не увеличение числа аномальных клеток в крови - лейкозный или алейкозный (сублейкозный). Мышиная модель лейкоза широко признается как такая, что предвещает *in vivo* анти-лейкозную активность. Полагают, что соединение, которое дает

положительный результат теста в анализе P388 клеток, как правило, будут демонстрировать некоторый уровень анти-лейкозной активности, независимо от типа лейкоза, подвергаемого лечению. Соответственно, настоящее изобретение включает способ лечения лейкоза, включая лечение острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого гранулоцитарного лейкоза, хронический гранулоцитарного лейкоза, острого промиелоцитарного лейкоза, лейкоз взрослых Т-клеток, алейкозного лейкоза, лейкоцитемичного лейкоза, базофильного лейкоза, недифференцируемого лейкоза, бычьего лейкоза, хронического миелоцитарного лейкоза, поражения кожи при лейкозе, эмбрионального лейкоза, эозинофильного лейкоза, лейкоза Гросса, волосато-клеточного лейкоза, гемобластного лейкоза, гемоцитобластного лейкоза, гистиоцитарного лейкоза, лейкоза стволовых клеток, острого моноцитарного лейкоза, лейкопенического лейкоза, лимфатического лейкоза, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лимфогенного лейкоза, лимфоидного лейкоза, лимфосаркомо-клеточного лейкоза, тучноклеточного лейкоза, мегакариоцитарного лейкоза, микромиелобластного лейкоза, моноцитарного лейкоз, миелобластного лейкоза, миелоцитарного лейкоза, миелоидного гранулоцитарного лейкоза, миеломоноцитарного лейкоза, лейкоза Нейджели, плазматического лейкоза, множественной миеломы, плазматического лейкоза, промиелоцитарный лейкоза, лейкоза клеток Ридера, лейкоза Шиллинга, лейкоза стволовых клеток, сублейкозного лейкоз и недифференцированного клеточного лейкоза.

**[0110]** Термин "саркома" обычно относится к опухоли, которая состоит из вещества подобного эмбриональной соединительной ткани и обычно состоит из плотно упакованных клеток, погруженных в фибриллярное или гомогенное вещество. Саркомы, которые можно лечить с использованием комбинации противоопухолевого тиол-связывающего митохондриального окислителя и противоракового агента включают хондросаркому, фибросаркому, лимфосаркому, меланосаркому, миксосаркому, остеосаркому, саркома Абемети, инфильтрирующую липому, липосаркому, саркому альвеолярной мягкой части, амелобластную саркому, ботриоидную саркому, хлорлейкозную саркому, хорио карциному, эмбриональную саркому, опухолевую саркому Вильмса, эндометриальную саркому, стромальную саркому, саркому Юинга, фасциальную саркома, фибробластную саркому, гигантоклеточную саркому, гранулоцитарную саркому, саркому Ходжкина, идиопатическую множественную пигментированную геморрагическую саркому, иммунобластную саркому В-клеток,

лимфому, иммунобластную саркому Т-клеток, саркому Дженсена, саркому Капоши, саркому купферовских клеток, ангиосаркому, лейкосаркому, злокачественную мезенхимальную саркому, паростальную саркому, ретикулоцитарную саркому, саркому Рауса, сероцистосаркому, синовиальную саркому и телеангиэктатической саркому.

**[0111]** Термин "меланома" берется для обозначения опухоли, возникающей из меланоцитарной системы кожи и других органов. Меланомы, которые можно лечить с использованием комбинации противоопухолевого тиол-связывающего митохондриального окислителя и противоракового агента, включают, например, акральную лентигозную меланому, беспигментную меланому, доброкачественную ювенильную меланому, меланому Клаудмана, S91 меланому, меланому Гардинг-Пасси, ювенильную меланому, лентиго злокачественную меланому, злокачественную меланому, узловую меланому, подногтевую меланому и поверхностную распространяющуюся меланому.

**[0112]** Термин "карцинома" касается злокачественного нового роста, состоящего из эпителиальных клеток, имеющих тенденцию проникать в окружающие ткани и вызывать метастазы. Типичные виды карциномы, которые можно лечить с использованием комбинации противоопухолевого тиол-связывающего митохондриального окислителя и противоракового агента, включают, например, железистую карциному, аденокарциному, аденокистозную карциному, железисто-кистозную карциному, аденомотозную карциному, карциному коры надпочечников, альвеолярную карциному, альвеолярную клеточную карциному, базально-клеточную карциному, базоцеллюлярную карциному, базалоидную карциному, базальную плоскоклеточную карциному, бронхиоальвеолярную карциному, бронхиолярную карциному, бронхогенную карциному, медуллярную карциному, холангиоцеллюлярную карциному, хорионическую карциному, коллоидную карциному, комедокарциному, карциному свода, решетчатовидную карциному, карциному плевры, карциному кожи, цилиндрическую карциному, цилиндрическую клеточную карциному, дуктальную карциному, карциному дурум, эмбриональную карциному, круглоклеточную карциному, эпидермоидную карциному, карциному эпителиальных аденоидов, экзофитную карциному, карциному из язвы, фиброзную карциному, желеобразную карциному, коллоидную карциному, гигантоклеточную карциному, гигантоцеллюлярную карциному, железистую карциному, гранулезоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, гематоидную карциному, гепатоцеллюлярную карциному, карциному из клеток Гюртля, гиалиновую

карциному, гипернефроидную карциному, начальную эмбриональную карциному, карциному *in situ*, внутриэпидермальную карциному, внутриэпителиальную карциному, карцинома Кромпечера, карциному клеток Кульчицкого, большую клеточную карциному, хрусталиковую карциному, карциному хрусталика, липоматозную карциному, лимфоэпителиальную карциному, карциному костного мозга, медуллярную карцинома, меланотическую карциному, карциному Молле, слизиобразующую карциному, муциновую карциному, мукоцеллюлярную карциному, мукоэпидермоидную карциному, карциному слизистой оболочки, мукозную карциному, карциному миксоматод, назофарингальную карциному, овсяноклеточную карциному, оссифицирующую карциному, остеоидную карциному, папиллярную карциному, перипортальную карциному, преинвазивную карциному, шиловидноклеточную карциному, слизиобразующую карциному, почечно-клеточную карциному почки, резервоклеточную карциному, карциному саркоматодов, карциному Шнайдера, скirrosную карциному, карцинома скроти, перстневидноклеточную карциному, недифференцированную карциному, мелкоклеточную карцинома, соленоидную карцинома, сфероидноклеточную карциному, веретенноклеточную карцинома, губчатую карцинома, сквамозную карциному, плоскоклеточную карциному, струнную карциному, телеангиэктатическую карциному, карциному из гладких мышечных волокон и сосудистой ткани, переходно-клеточную карциному, шишковидную карциному, туберозную карциному, бородавчатую карциному, и ворсистую карциному.

**[0113]** “Противораковые агент” используют в соответствии с его обычным и общепринятым значением и касается композиции (например, соединения, лекарственного средства, антагониста, ингибитора, модулятора), имеющей противоопухолевые свойства или способность ингибировать рост или пролиферацию клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения, противораковые агент является химиотерапевтическим. Противораковый агент может быть агентом, одобрением FDA или аналогичным регулирующим органом страны, кроме США, для лечения рака.

**[0114]** Примеры противораковых агентов включают, но не ограничиваются этим, ингибиторы MEK (например, MEK1, MEK2, или MEK1 и MEK2) (например, XL518, CI-1040, PD035901, селуметиниб/ AZD6244, GSK1120212/ траметиниб, GDC-0973, ARRY-162, ARRY-300, AZD8330, PD0325901, U0126, PD98059, TAK-733, PD318088, AS703026, BAY 869766), алкилирующие агенты (например, циклофосфамид, ифосфамид,

хлорамбуцил, бусульфан, мелфалан, мехлорэтамин, урамустин, тиотепу, нитрозомочевины, мустарген (например, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, мелфалан), этиленимин и метилмеламины (например, гексаметилмеламин, тиотепу), алкилсульфонаты (например, бусульфан), нитрозомочевины (например, кармустин, ломустин, семустин, стрептозоцин), триазены (декарбазин)), антиметаболиты (например, 5-азатиоприн, лейковорин, капецитабин, флударабин, гемцитабин, пеметрексед, ралтитрексед, аналог фолиевой кислоты (например, метотрексат), или аналоги пиримидина (например, фторурацил, флоксоуридин, цитарабин), аналоги пурина (например, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин), и т.д.), растительные алкалоиды (например, винкристин, винбластин, винорелбин, виндезин, подофиллотоксин, паклитаксел, доцетаксел и т.д.), ингибиторы топоизомеразы (например, иринотекан, топотекан, амсакрин, этопозид (VP16) , этопозид фосфат, тенипозид и т.д.), противоопухолевые антибиотики (например, доксорубицин, адриамицин, даунорубицин, эпирубицин, актиномицин, блеомицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин и т.д.), соединения на основе платины (например, цисплатин, оксоплатин, карбоплатин), антрацендион (например, митоксантрон), замещенную мочевины (например, гидроксимочевину), производное метилгидразина (например, прокарбазин), адренкортикальное супрессивное средство (например, митотан, аминоклютетимид), эпиподофиллотоксины (например, этопозид), антибиотики (например, даунорубицин, доксорубицин, блеомицин), ферменты (например, L-аспарагиназа), ингибиторы митоген-активированного сигналинга протеинкиназы (например, U0126, PD98059, PD184352, PD0325901, ARRY-142886, SB239063, SP600125, BAY 43-9006, вортманнин, или LY294002, ингибиторы Syk, ингибиторы mTOR, антитела (например, ритуксан), госсифол, генасенс, полифенол E, хлорфузин, все транс-ретиновые кислоты (ATRA), бриостатин, фактор некроза опухолей, связанный с апоптоз-индуцирующим лигандом (TRAIL), 5-аза-2'-дезоксцитидин, все транс-ретиновые кислоты, доксорубицин, винкристин, этопозид, гемцитабин, иматиниб (Gleevec.RTM.), гелданамицин, 17-N-аллиламино-17-дезметоксигелданамицин (17-AAG), флавопиридол, LY294002, бортезомиб, трастузумаб, BAY 11-7082, PKC412, PD184352, 20-эпи-1, 25 дигидроксивитамин D3; 5-этинилурацил; абиратерон; акларубицин; ацилфульвен; адецинопенол; адозелезин; алдеслейкин; антагонисты ALL-ТК; альтретамин; амбамустин; амидокс; амифостин; аминоклевулиновую кислоту; амрубицин; амсакрин; анагрелид; анастрозол; андрографолид; ингибиторы ангиогенеза; антагонист D; антагонист G; антареликс; анти-дорсализирующий

морфогенетический белок-1; антиандрогенный рак предстательной железы; антиэстроген; антинеопластон; антисмысловые олигонуклеотиды; афидиколина глицинат; модуляторы гена апоптоза; регуляторы апоптоза; апуриновую кислоту; ара-CDP-DL-PTBA; аргининдезаминазу; асулакрин; атаместан; атримустин; аксинастатин 1; аксинастатин 2; аксинастатин 3; азасетрон; азатоксин; азатирозин; производные баккатина III; баланол; батимастат; антагонисты BCR/ABL; бензохлорины; бензоилстауроспорин; бета-лактамы производные; бета-алетин; бетакламицин В; бетулиновую кислоту; ингибитор bFGF; бикалутамид; бисантрен; бисазиридирилспермин; биснафид; бистратен А; бизелезин; брефлат; бропиримин; будотитан; бутионина сульфоксимин; кальципотриол; кальфостин С; производные камптотецина; канарипокс II-2; капецитабин; карбоксамид-амино-триазол; карбоксамидотриазол; CaRest M3; CARN 700; полученный из хряща ингибитор; карзелезин; ингибиторы казеинкиназы (ICOS); кастаноспермин; цекропин В; цетрореликс; хлорины; хлорхиноксалин сульфонамид; цикапрост; цис-порфирин; кладрибин; аналоги кломифена; клотримазол; коллисмидин А; коллисмидин В; комбретастатин А4; аналог комбретастатины; конагенин; крамбесцидин 816; криснатол; криптофицин 8; производные криптофицина А; курацин А; циклопентантрахиноны; циклоплатам; ципемидин; цитарабина оксфосфат; цитолитический фактор; цитостатин; дакликсимаб; децитабин; дегидродидемнин В; деслорелин; дексаметазон; дехифосфамид; дексразоксан; дексверапамил; диазихон; дидемнин В; дидокс; диэтилнорспермин; дигидро-5-азацитидин; 9-диоксамицин; дифенилспиромустин; докозанол; доласетрон; доксифлуридин; дролоксифен; дронабинол; дуокармицина SA; эбселен; экомустин; эдельфозин; эдреколомаб; эфлорритин; элемен; эмитефур; эпирубицин; эпистерид; аналог эстрамустина; агонисты эстрогена; антагонисты эстрогена; этанидазол; этопозид фосфат; экземестан; фадрозол; фазарабин; фенретинид; филграстим; финастерид; флавопиридол; флезеластин; флауастерон; флударабин; фтордаунорунцицина гидрохлорид; форфенимекс; форместан; фостриецин; фотемустин; гадолиния тексафирин; нитрат галлия; галоцитабин; ганиреликс; ингибиторы желатиназы; гемцитабин; ингибиторы глутатиона; гепсульфам; херегулин; гексаметилен бисацетамид; гиперидин; ибандроновую кислоту; идаруцибин; идоксифен; идрамантон; илмофозин; иломастат; имидазопиридин; имиквимод; иммуностимулирующее пептиды инсулиноподобный ингибитор рецептора фактора роста-1; агонисты интерферона; интерфероны; интерлейкины; иобенгуан; йододоксорубицин; ипомеанол, 4-; иропласт; ирсогладин; изобенгазол; изогомогаликондрин В; итасетрон; ясплакинолид; кахалалид F; ламелларин-

N триацетат; ланреотид; лейнамицин; ленограстим; лентинана сульфат; лептолстатин; летрозол; лейкоз-ингибирующий фактор; лейкоцитарный альфа-интерферон; лейпролид+эстроген+прогестерон; лейпрорелин; левамизол; лиарозол; линейный аналог полиамина; липофильный дисахаридный пептид; липофильные соединения платины; лиссоклиналид 7; лобоплатин; ломбрицин; лометрексол; лонидамин; лозоксантрон; ловастатин; локсорибин; лутротекан; лютеция тексафирин; лизофиллин; литические пептиды; меитанзин; манностатин А; маримастат; масопротекол; маспин; ингибиторы матрилизина; ингибиторы матричной металлопротеиназы; меногарил; мербарон; метерелин; метиониназу; метоклопрамид; ингибитор MIF; мифепристон; мильтефозин; миримостим; несогласованную двухцепочечную РНК; митогуазон; митолактол; аналоги митомицина; митонафид; митотоксиновый фибробластный фактор-сапорин роста; митоксантрон; мофаротен; молграмостим; моноклональное антитело, человеческий хорионический гонадотропин; монофосфориллипид А+микобактериальная клеточная стенка sk; мопидамол; ингибитор гена мультирезистентности к лекарственному средству; множественный опухолевый супрессор 1-основной терапии; мустардный противораковый агент; микапероксид В; экстракт микобактериальной клеточной стенки; мирапапорон; N-ацетилдиналин; N-замещенные бензамиды; нафарелин; нагрестип; налоксон+пентазоцин; напавин; нафтерпин; нартограстим; недаплатин; неморубицин; неридроновую кислоту; нейтральную эндопептидазу; нилютамид; низамицин; модуляторы оксида азота; нитроксидный антиоксидант; нитруллин; Об-бензилгуанин; октреотид; окиценон; олигонуклеотиды; онапристон; ондансетрон; ондансетрон; орацин; пероральный цитокиновый индуктор; ормаплатин; осатерон; оксалиплатин; оксауномицин; палауамин; пальмитоилтризоксин; памидроновую кислоту; панакситрол; паномифен; парабактин; пазеллиптин; пегаспаргазу; пелдезин; пентозанполисульфат натрия; пентостатин; пентрозол; перфлуброн; перфосфамид; периллиловый спирт; феназиномицин; фенилацетат; ингибиторы фосфатазы; пицибанил; пилокарпина гидрохлорид; пирарубицин; пиритрексим; плацетин А; плацетин В; ингибитор активатора плазминогена; комплекс платины; соединения платины; платино-триаминовый комплекс; порфимер натрия; порфирамицин; преднизолон; пропилен-бис-акридон; простагландин J2; ингибиторы протеасомы; иммуномодулятор на основе белка А; ингибитор протеинкиназы С; ингибиторы протеинкиназы С, микроводорослей; ингибиторы протеинтирозинфосфатазы; ингибиторы пуриновой нуклеозидной фосфорилазы; пурпурины; пиразолоакридин; пиридокселированный гемоглобинполиоксиэтилен

конъюгат; raf-антагонисты; ралтитрексед; рамосетрон; ингибиторы gas  
 фарнезилпротеинтрансферазы; gas ингибиторы; gas-GAP ингибитор; ретеллиптин  
 деметилированный; рения Re 186 этидронат; ризоксин; рибозимы; RII ретинамид;  
 роглетимид; рохитукин; ромуртид; рохинимекс; рубигинон B1; рубоксил; сафингол;  
 саинтопин; SarCNU; саркофитол А; сарграмостим; Sdi 1 миметики; семустин; старение-  
 производный ингибитор 1; смысловые олигонуклеотиды; ингибиторы сигнальной  
 трансдукции; модуляторы сигнальной трансдукции; одноцепочечный антиген-  
 связывающий белок; сизофуран; собузоксан; натрия борокапнат; натрия фенилацетат;  
 солверол; соматомедин-связывающий белок; сонермин; спарфосовую кислоту;  
 спикамицин D; спирумустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; ингибитор  
 стволовых клеток; ингибиторы деления стволовых клеток; стипиамид; ингибиторы  
 стромелизина; сульфинозин; суперактивный вазоактивный антагонист кишечного  
 пептида; сурадисту; сурамин; сваинсонин; синтетические гликозаминогликаны;  
 таллимустин; тамоксифенметидид; тауромустин; тазаротен; текогалан натрия; тегафур;  
 теллурапирилиум; ингибиторы теломеразы; темопорфин; темозоломид; тенипозид;  
 тетрахлордекаоксид; тетразомин; талибластин; тиокоралин; тромбопоэтин; тромбопоэтина  
 миметик; тималфазин; агонист рецептора тимопоэтина; тимотринан;  
 тиреостимулирующий гормон; оловоэтилэтиопурпурин; тирапазамин; титаноцена  
 бихлорид; топсентин; торемифен; тотипотентный фактор стволовых клеток; ингибиторы  
 трансяции; третиноин; триацетилуридин; трицирибин; триметрексат; трипторелин;  
 трописетрон; туростерид; ингибиторы тирозинкиназы; тирфостины; ингибиторы UBC;  
 убенимекс; урогенитальный фактор, ингибирующий рост синусового происхождения;  
 антагонисты рецептора урокиназы; вапреотид; вариолин В; векторная система,  
 эритроцитгенную терапию; веларесол; верамин; вердинс; вертепорфин; винорелбин;  
 винксалтин; витайксин; ворозол; занотерон; зениплатин; зиласкорб; зиностатина  
 стималамер, адриамицин, дактиномицин, блеомицин, винбластин, цисплатин, ацивицин;  
 акларубицин; акодазола гидрохлорид; акронин; адозелезин; алдеслейкин; алтретамин;  
 амбомицин; аметантрона ацетат; аминоклютетимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин;  
 аспарагиназу; асперлин; азациитидин; азетепу; азотомидин; батимастат; бензодепу;  
 бикалутаид; бисантрена гидрохлорид; биснафида димезилат; бизелезин; блеомицина  
 сульфат; бреквинарома натрия; бропиримин; бусульфат; кактиномицин; калустерон;  
 карацемид; карбетимер; карбоплатин; кармустилин; карубицина гидрохлорид; карзелезин;  
 цедефингол; хлорамбуцил; циролемицин; кладрибин; криснатоа мезилат; циклофосфамид;

цитарабин; дакарбазин; даунорубицина гидрохлорид; децитабин; дексормаплатин; дезагуанин; дезагуанина мезилат; диазихон; доксорубицин; доксорубицина гидрохлорид; дролоксифен; дролоксифена цитрат; дромостанолон пропионат; дуазомицин; эдатрексат; эфлорнитина гидрохлорид; элсамитруцин; энлоплатин; энпромат; эпипропидин; эпирубицина гидрохлорид; эрбулозол; эсорубицина гидрохлорид; эстрамустин; эстрамустинфосфат натрия; этанидазол; этопозид; этопозид фосфат; этоприн; фадрозол гидрохлорид; фазарабин; фенретинид; флоксуридин; флударабина фосфат; фторурацил; фторцитабин; фосхидон; фостриецин натрия; гемцитабин; гемцитабина гидрохлорид; гидроксимочевина; идаруцибина гидрохлорид; ифосфамид; имофозин; интерлейкин II (включая рекомбинантный интерлейкин II, или rIL.sub,2), интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа-n1; интерферон альфа-n3; интерферон бета-1a; интерферон гамма-1b; ипроплатин; иринотекана гидрохлорид; ланреотида ацетат; летрозол; лейпролида ацетат; лиарозола гидрохлорид; лометрексол натрия; ломустин; лозоксантрона гидрохлорид; масопрокол; майтансин; мехлорэтамина гидрохлорид; мегестролацетат; меленгестрола ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрия; метоприн; метуридепу; митиндомид; митокарцин; митокромин; митогиллин; митомалцин; митомицин; митоспер; митотан; митоксантрона гидрохлорид; микофенолокислоту; нокодазол; ногаламицин; ормаплатин; оксисуран; пегаспаргазу; пелиомицин; пентамустин; пепломицина сульфат; перфосфамид; пипоброман; пипосульфат; пироксантрона гидрохлорид; пликамицин; пломестан; порфимер натрия; порфиروмицин; преднимустин; прокарбазина гидрохлорид; пуромицин; пуромицина гидрохлорид; пиразофурин; рибоприн; роглетимид; сафингол; сафингола гидрохлорид; семустин; симтразен; спарфосат натрия; спарсомицин; спирогермания гидрохлорид; спиromустин; спироплатин; стрептонигрин; стрептозоцин; сулофенур; талисомицин; текогалан натрия; тегафур; телоксантрона гидрохлорид; темопорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотепу; тиазофурина; тирапазамин; торемифена цитрат; трестолон ацетат; трицирибина фосфат; триметрексат; триметрексата глюкуронат; трипторелин; тубулозола гидрохлорид; урацилмустард; уредепу; вапреотид; вертепорфин; винбластин сульфат; винкристина сульфат; виндезин; виндезина сульфат; винепидина сульфат; винглицината сульфат; винлеурозина сульфат; винорелбина тартрат; винрозицина сульфат; винзолидина сульфат; ворозол; зенаплатин; зиностатин; зорубицина гидрохлорид, агенты, которые останавливают клетки в фазах G2-M и/или модулируют образование или стабильность микротрубочек, (например,

Таксол.ТМ (т.е. паклитаксел), таксотер.ТМ, соединения, содержащие таксановый скелет, эрбулозол (т.е. R-55104), доластатин 10 (т.е. DLS-10 и NSC-376128), мивобулина изетионат (т.е., как CI-980), винкристин, NSC-639829, дискодермолид (т.е., как NVP-XX-A-296), АВТ-751 (Abbott, т.е. E-7010), алторхиртины (например, алторхиртин А и алторхиртин С), спонгистатины (например, спонгистатин 1, спонгистатин 2, спонгистатин 3, спонгистатин 4, спонгистатин 5, спонгистатин 6, спонгистатин 7, спонгистатин 8 и спонгистатин 9), цемадотина гидрохлорид (т.е. LU-103793 и NSC-D-669356), эпотилоны (например, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С (т.е. дезоксиэпотилон А или dЕроА), эпотилон D (т.е. KOS-862, dЕроВ, и дезоксиэпотилон В), эпотилон Е, эпотилон F, эпотилон В N-оксид, эпотилон А N-оксид, 16-аза-эпотилон В, 21-аминоэпотилон В (т.е. BMS-310705), 21-гидроксиэпотилон D (т.е. дезоксиэпотилон F и dЕроF), 26-фторэпотилон, ауристатин PE (т.е. NSC-654663), соблитодин (т.е. TZT-1027), LS-4559-P (Pharmacia, т.е. LS-4577), LS-4578 (Pharmacia, т.е. LS-477-P), LS-4477 (Pharmacia), LS-4559 (Pharmacia), RPR-112378 (Aventis), винкристина сульфат, DZ-3358 (Daiichi), FR-182877 (Fujisawa, т.е. WS-9885B), GS-164 (Takeda), GS-198 (Takeda), KAR-2 (Hungarian Academy of Sciences), BSF-223651 (BASF, т.е. ILX-651 и LU-223651), SAN-49960 (Lilly/Novartis), SDZ-268970 (Lilly/Novartis), AM-97 (Armad/Kyowa Hakko), AM-132 (Armad), AM-138 (Armad/Kyowa Hakko), IDN-5005 (Indena), криптофицин 52 (т.е. LY-355703), AC-7739 (Ajinomoto, т.е. AVE-8063A и CS-39.HCl), AC-7700 (Ajinomoto, т.е. AVE-8062, AVE-8062A, CS-39-L-Ser.HCl и RPR-258062A), вителивуамид, тубулизин А, канаденсол, centaureидин (т.е. NSC-106969), T-138067 (Tularik, т.е. T-67, TL-138067 и TI-138067), COBRA-1 (Parker Hughes Institute, т.е. DDE-261 и WHI-261), H10 (Kansas State University), H16 (Kansas State University), онкодицин А1 (т.е. BTO-956 и DIME), DDE-313 (Parker Hughes Institute), фиджанолид В, лаулималид, SPA-2 (Parker Hughes Institute), SPA-1 (Parker Hughes Institute, т.е. SPIKET-P), 3-IAABU (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine, т.е. MF-569), наркосин (также известный как NSC-5366), наскапин, D-24851 (Asta Medica), A-105972 (Abbott), гемиастерлин, 3-BAABU (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine, т.е. MF-191), TMPN (Arizona State University), ванадоценацетилацетонат, T-138026 (Tularik), монсатрол, лнаноцин (т.е. NSC-698666), 3-IAABE (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine), A-204197 (Abbott), T-607 (Tularik, т.е. T-900607), RPR-115781 (Aventis), элеутеробины (такой как дезметилэлеутеробин, дезаэтилэлеутеробин, изоэлеутеробин А, и Z-Элеутеробин), карибаеозид, карибаеолин, галихондрин В, D-64131 (Asta Medica), D-68144 (Asta Medica), диазонамид А, A-293620 (Abbott), NPI-2350 (Nereus), таккалонолид А, TUB-245 (Aventis),

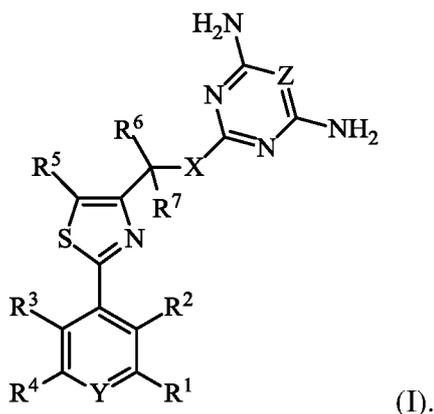
A-259754 (Abbott), диозостатин, (-)-фенилагистин (т.е. NSCL-96F037), D-68838 (Asta Medica), D-68836 (Asta Medica), миосеверин В, D-43411 (Zentaris, т.е. D-81862), A-289099 (Abbott), A-318315 (Abbott), НТИ-286 (т.е. SPA-110, трифторацетатная соль) (Wyeth), D-82317 (Zentaris), D-82318 (Zentaris), SC-12983 (NCI), ресверастатинфосфат натрия, BPR-OY-007 (National Health Research Institutes), и SSR-250411 (Sanofi)), стероиды (например, дексаметазон), финастерид, ингибиторы ароматазы, агонисты гормона высвобождения гонадотропина (GnRH), такие как гозерелин или леупролид, адренкортикостероиды (например, преднизон), прогестины (например, гидроксипрогестерона капроат, мегестрола ацетат, медроксипрогестерона ацетат), эстрогены (например, диэтилстилбестрол, этинилэстрадиол), антиэстрогены (например, тамоксифен), андрогены (например, тестостерона пропионат, флюоксиместерон), антиандрогены (например, флутамид), иммуностимуляторы (например, Бацилла Кальметта–Герена (БЦЖ), левамизол, интерлейкин-2, альфа-интерферон, т.п.), моноклональные антитела (например, анти-CD20, анти-HER2, анти-CD52, анти-HLA-DR, и анти-VEGF моноклональные антитела), иммунотоксины (например, анти CD33-моноклональный конъюгат антитело-калихеамицин, анти-CD22 моноклональный конъюгат антитело-псевдомонас-экзотоксин, т.п.), радиоиммунотерапию (например, анти-CD20 моноклональное антитело, конъюгированное с  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  или  $^{131}\text{I}$ , т.п.), триптолид, гомогаррингтонин, дактиномицин, доксорубицин, эпирубицин, топотекан, итраконазол, виндезин, церивастатин, винкристин, дезоксиаденозин, сертралин, питавастатин, иринотекан, клофазимин, 5-нонилокситриптамин, вемурафениб, дабрафениб, эрлотиниб, гефитиниб, ингибиторы EGFR, терапию нацеленную на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) или терапевтический (например, гефитиниб (Iressa™), эрлотиниб (Tarceva™), цетуксимаб (Erbix™), лапатиниб (Tykerb™), панитумумаб (Vectibix™), вандетаниб (Caprelsa™), афатиниб/BIBW2992, CI-1033/канертиниб, нератиниб/НКИ-272, CP-724714, TAK-285, AST-1306, ARRY334543, ARRY-380, AG-1478, дакоминитиниб/PF299804, OSI-420/дезметилэрлотиниб, AZD8931, АЕЕ788, пелитиниб/ЕКВ-569, CUDC-101, WZ8040, WZ4002, WZ3146, AG-490, XL647, PD153035, BMS-599626), сорафениб, иматиниб, сунитиниб, дазатиниб, и т.п.

**[0115]** “Химиотерапевтический” или “химиотерапевтический агент” используется в соответствии с его обычным стандартным значением и касается химической композиции или соединения, имеющего противоопухолевые свойства или способность ингибировать рост или пролиферацию клеток.

[0116] “Организм модели рака”, как используется в данном документе, представляет собой организм, демонстрирующий фенотип, свойственный раку, или активность вызывающих рак элементов, внутри организма. Термин рак определяется выше. Широкое разнообразие организмов может служить в качестве организмов модели рака, и включают, например, раковые клетки и организмы млекопитающих, таких как грызуны (например, мышь или крыса) и приматы (такие как, люди). Линии раковых клеток широко понимаются квалифицированным специалистом в данной области как клетки, демонстрирующие фенотипы или генотипы, аналогичные *in vivo* видам рака. Линии раковых клеток, как используется в данном документе, включает клеточные линии от животных (например, мышей) и от людей.

### I. Композиции

[0117] Представленными в данном документе являются соединения, имеющие формулу:



[0118] Y представляет собой C(R<sup>8</sup>) или N. Z представляет собой C(R<sup>9</sup>) или N. X представляет собой -CH<sub>2</sub>-, -O-, -N(R<sup>10</sup>)-, -S-, -S(O)- или -S(O)<sub>2</sub>-. R<sup>1</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>1A</sup>, -OR<sup>1A</sup>, -NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -C(O)OR<sup>1A</sup>, -C(O)NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>R<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>OR<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NHNR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -ONR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NHC(O)NHNR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил. R<sup>2</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>2A</sup>, -OR<sup>2A</sup>, -NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -C(O)OR<sup>2A</sup>, -C(O)NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>R<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>OR<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NHNR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -ONR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NHC(O)NHNR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный

циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.  $R^3$  представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{3A}$ ,  $-OR^{3A}$ ,  $-NR^{3A}R^{3B}$ ,  $-C(O)OR^{3A}$ ,  $-C(O)NR^{3A}R^{3B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{3A}$ ,  $-S(O)_{n3}R^{3A}$ ,  $-S(O)_{n3}OR^{3A}$ ,  $-S(O)_{n3}NR^{3A}R^{3B}$ ,  $-NHN R^{3A}R^{3B}$ ,  $-ONR^{3A}R^{3B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{3A}R^{3B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.  $R^4$  представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{4A}$ ,  $-OR^{4A}$ ,  $-NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-C(O)OR^{4A}$ ,  $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}R^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}OR^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NHN R^{4A}R^{4B}$ ,  $-ONR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{4A}R^{4B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.  $R^5$  независимо представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{5A}$ ,  $-OR^{5A}$ ,  $-NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-C(O)OR^{5A}$ ,  $-C(O)NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}R^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}OR^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NHN R^{5A}R^{5B}$ ,  $-ONR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{5A}R^{5B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил, где  $R^5$  и  $R^6$  необязательно объединяются с образованием замещенного или незамещенного циклоалкила.  $R^6$  представляет собой незамещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил.  $R^7$  представляет собой H, D, F или  $-CH_3$ .  $R^8$  представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{8A}$ ,  $-OR^{8A}$ ,  $-NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-C(O)OR^{8A}$ ,  $-C(O)NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{8A}$ ,  $-S(O)_{n8}R^{8A}$ ,  $-S(O)_{n8}OR^{8A}$ ,  $-S(O)_{n8}NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NHN R^{8A}R^{8B}$ ,  $-ONR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{8A}R^{8B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.  $R^9$  представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{9A}$ ,  $-OR^{9A}$ ,  $-NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-C(O)OR^{9A}$ ,  $-C(O)NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}R^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}OR^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NHN R^{9A}R^{9B}$ ,  $-ONR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{9A}R^{9B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или

незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.  $R^{10}$  представляет собой H,  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$ ,  $-C_3H_7$ ,  $-CH_2C_6H_5$ .  $R^{1A}$ ,  $R^{1B}$ ,  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{8A}$ ,  $R^{8B}$ ,  $R^{9A}$ , и  $R^{9B}$  независимо представляют собой водород, оксо, галоген,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-S(O)_2Cl$ ,  $-S(O)_3H$ ,  $-S(O)_4H$ ,  $-S(O)_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-NHS(O)_2H$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил. Символы n1, n2, n3, n4, n5, n8 и n9 независимо представляют собой 1, 2 или 3.

**[0119]**  $R^1$  может представлять собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{1A}$ ,  $-OR^{1A}$ ,  $NR^{1A}R^{1B}$ ,  $-C(O)OR^{1A}$ ,  $-C(O)NR^{1A}R^{1B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{1A}$ ,  $-S(O)_{n1}R^{1A}$ ,  $-S(O)_{n1}OR^{1A}$ ,  $-S(O)_{n1}NR^{1A}R^{1B}$ ,  $-NHNR^{1A}R^{1B}$ ,  $-ONR^{1A}R^{1B}$  или  $-NHC(O)NHNR^{1A}R^{1B}$ .  $R^1$  может представлять собой водород, галоген,  $-OR^{1A}$ .  $R^1$  может представлять собой водород.  $R^1$  может представлять собой галоген.  $R^1$  может представлять собой  $-OR^{1A}$ .  $R^{1A}$  является таким, как описано в данном документе.

**[0120]**  $R^1$  может представлять собой водород, галоген,  $-OR^{1A}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0121]**  $R^1$  может представлять собой  $-OR^{1A}$ , где  $R^{1A}$  является таким, как описано в данном документе.  $R^1$  может представлять собой  $-OR^{1A}$ , где  $R^{1A}$  представляет собой водород, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.  $R^1$  может представлять собой  $-OR^{1A}$ , где  $R^{1A}$  представляет собой замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.

**[0122]**  $R^1$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0123]**  $R^1$  может представлять собой  $R^{1A}$ -замещенный или незамещенный алкил,  $R^{1A}$ -замещенный или незамещенный гетероалкил,  $R^{1A}$ -замещенный или незамещенный











представлять собой замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> алкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> алкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> алкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>1A</sup>, где m представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4 или 5. Символ m может представлять собой 1. Символ m может представлять собой 2. Символ m может представлять собой 3. Символ m может представлять собой 4. Символ m может представлять собой 5.

**[0137]** L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный или незамещенный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой незамещенный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный или незамещенный 2 - 20 членный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный 2 - 20 членный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный или незамещенный 2 - 10 членный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный 2 - 10 членный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой незамещенный 2 - 10 членный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный или незамещенный 2 - 6 членный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой замещенный 2 - 6 членный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой незамещенный 2 - 6 членный гетероалкилен. L<sup>1A</sup> может представлять собой -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>m1</sub>-R<sup>1A</sup>, где m1 представляет собой целое число 1, 2, 3, или 4. Символ m1 может представлять собой 1. Символ m1 может представлять собой 2. Символ m1 может представлять собой 3. Символ m1 может представлять собой 4.

**[0138]** R<sup>1</sup> может представлять собой -O-L<sup>1A</sup>-N(R<sup>1C</sup>)-S(O)<sub>n1</sub>-R<sup>1A</sup>. R<sup>1A</sup> является таким, как описано в данном документе. R<sup>1A</sup> может представлять собой водород или замещенный или незамещенный алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> алкил).

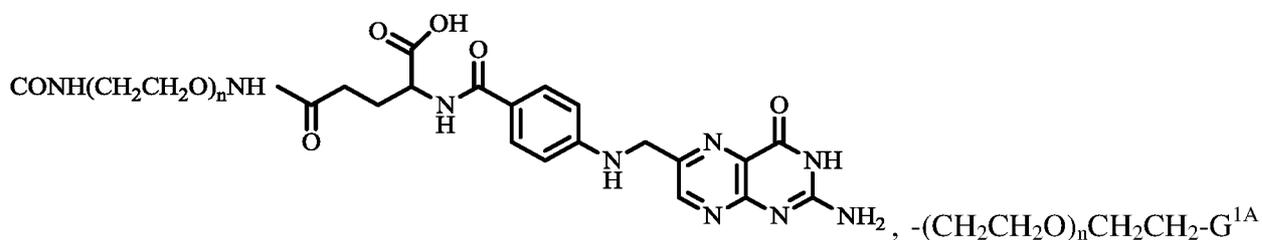
**[0139]** R<sup>1A</sup> представляет собой водород, галоген, оксо, -CF<sub>3</sub>, -CN, -OR<sup>12</sup>, -N(R<sup>12,1</sup>)(R<sup>12,2</sup>), -COOR<sup>12</sup>, -CON(R<sup>12,1</sup>)(R<sup>12,2</sup>), -NO<sub>2</sub>, -S(R<sup>12</sup>), -S(O)<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -S(O)<sub>3</sub>R<sup>12</sup>, -S(O)<sub>4</sub>R<sup>12</sup>, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>12,1</sup>)(R<sup>12,2</sup>), -NHN(R<sup>12,1</sup>)(R<sup>12,2</sup>), -ON(R<sup>12,1</sup>)(R<sup>12,2</sup>), -NHC(O)NHN(R<sup>12,1</sup>)(R<sup>12,2</sup>), -NHC(O)N(R<sup>12,1</sup>)(R<sup>12,2</sup>), -NHS(O)<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, -NHC(O)R<sup>12</sup>, -NHC(O)-OR<sup>12</sup>, -NHOR<sup>12</sup>, -OCF<sub>3</sub>, -

OCHF<sub>2</sub>, R<sup>11</sup>-замещенный или незамещенный алкил, R<sup>11</sup>-замещенный или незамещенный гетероалкил, R<sup>11</sup>-замещенный или незамещенный циклоалкил, R<sup>11</sup>-замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, R<sup>11</sup>-замещенный или незамещенный арил, или R<sup>11</sup>-замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0140]** R<sup>11</sup> представляет собой водород, галоген, оксо, -CF<sub>3</sub>, -CN, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -SH, -S(O)<sub>2</sub>Cl, -S(O)<sub>3</sub>H, -S(O)<sub>4</sub>H, -S(O)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -NHS(O)<sub>2</sub>H, -NHC(O)H, -NHC(O)-OH, -NHOH, -OCF<sub>3</sub>, -OCHF<sub>2</sub>, R<sup>12</sup>-замещенный или незамещенный алкил, R<sup>12</sup>-замещенный или незамещенный гетероалкил, R<sup>12</sup>-замещенный или незамещенный циклоалкил, R<sup>12</sup>-замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, R<sup>12</sup>-замещенный или незамещенный арил, или R<sup>12</sup>-замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0141]** R<sup>12</sup>, R<sup>12,1</sup> и R<sup>12,2</sup> независимо представляют собой водород, галоген, оксо, -CF<sub>3</sub>, -CN, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -SH, -S(O)<sub>2</sub>Cl, -S(O)<sub>3</sub>H, -S(O)<sub>4</sub>H, -S(O)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -NHS(O)<sub>2</sub>H, -NHC(O)H, -NHC(O)-OH, -NHOH, -OCF<sub>3</sub>, -OCHF<sub>2</sub>, незамещенный алкил, незамещенный гетероалкил, незамещенный циклоалкил, незамещенный гетероциклоалкил, незамещенный арил или незамещенный гетероарил.

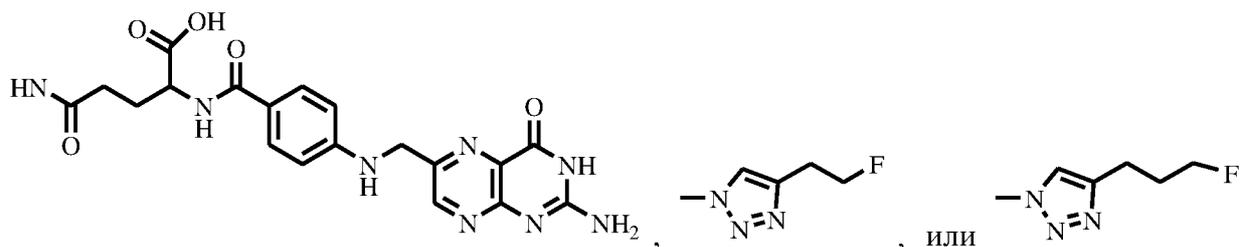
**[0142]** R<sup>1A</sup> может представлять собой -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -CD<sub>3</sub>, -CD<sub>2</sub>CD<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>F, -CH<sub>2</sub>CH(F)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH(F)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cl, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Cl, -CH<sub>2</sub>CH(Cl)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH(Cl)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,



или -COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-G<sup>1B</sup>. Символ n представляет собой 2 – 20. G<sup>1A</sup> представляет собой H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, F, Cl, -N<sub>3</sub>, -NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, -



$G^{1B}$  представляет собой H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, F, Cl,



Символ  $n$  может представлять собой 2-10. Символ  $n$  может представлять собой 2-8.

Символ  $n$  может представлять собой 2-5. Символ  $n$  может представлять собой 2, 3 или 4.

Символ  $n$  может представлять собой 3.

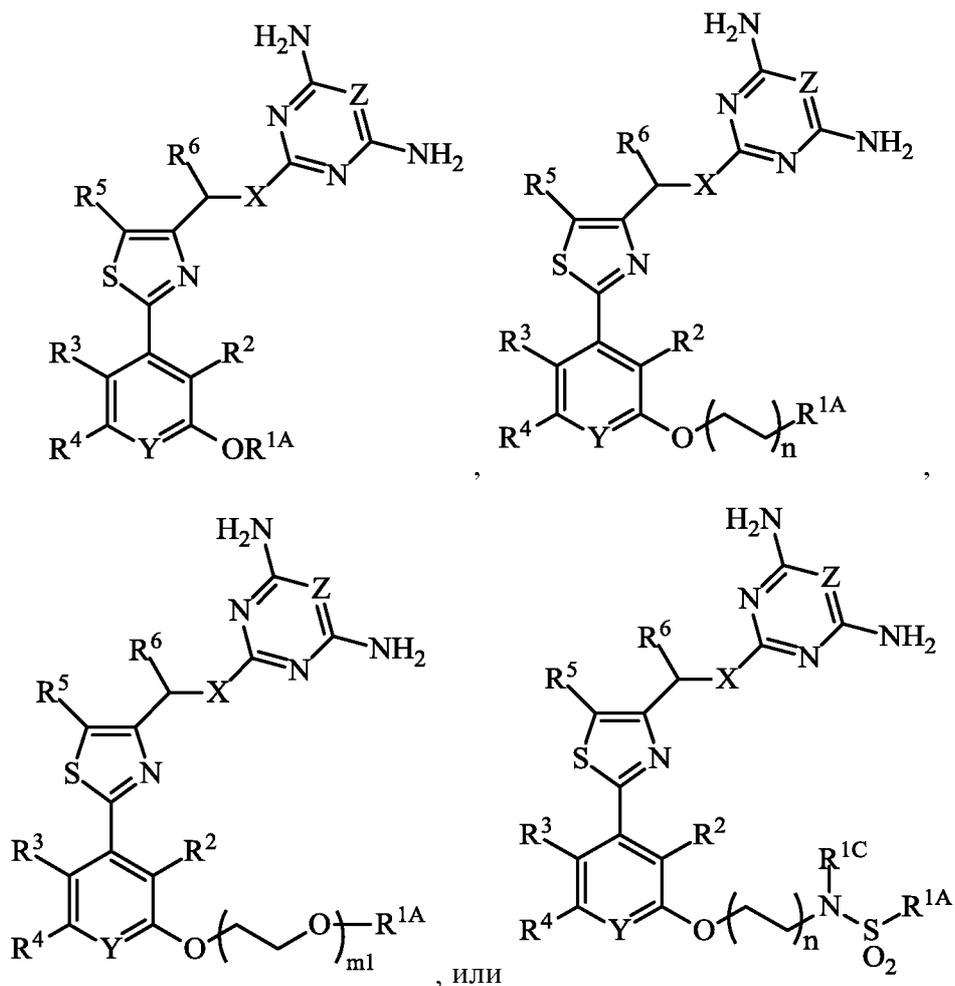
**[0143]**  $R^{1A}$  может представлять собой -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) <sub>$n$</sub> F, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) <sub>$n$</sub> CH<sub>3</sub>, где  $n$  представляет собой от 2 до 5.

**[0144]**  $R^{1B}$  и  $R^{1C}$  независимо представляют собой водород, галоген, оксо, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>Cl, -S(O)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -NHS(O)<sub>2</sub>H, -NHC(O)H, -NHC(O)-OH, -NHOH, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0145]**  $R^{1B}$  может представлять собой водород или замещенный или незамещенный алкил.

**[0146]**  $R^{1C}$  независимо представляют собой водород, галоген, оксо, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>Cl, -S(O)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -NHS(O)<sub>2</sub>H, -NHC(O)H, -NHC(O)-OH, -NHOH,  $R^{12}$ -замещенный или незамещенный алкил,  $R^{12}$ -замещенный или незамещенный гетероалкил,  $R^{12}$ -замещенный или незамещенный циклоалкил,  $R^{12}$ -замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,  $R^{12}$ -замещенный или незамещенный арил, или  $R^{12}$ -замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0147]** Соединение формулы (I) может иметь формулу:



**[0148]** Символ  $n$  является таким, как описано в данном документе. Символ  $n$  может представлять собой 1, 2, 3 или 4. Символ  $n$  может представлять собой 1. Символ  $n$  может представлять собой 2. Символ  $n$  может представлять собой 3. Символ  $n$  может представлять собой 4.

**[0149]**  $R^2$  может представлять собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{2A}$ ,  $-OR^{2A}$ ,  $-NR^{2A}R^{2B}$ ,  $-C(O)OR^{2A}$ ,  $-C(O)NR^{2A}R^{2B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{2A}$ ,  $-S(O)_{n2}R^{2A}$ ,  $-S(O)_{n2}OR^{2A}$ ,  $-S(O)_{n2}NR^{2A}R^{2B}$ ,  $-NHN R^{2A}R^{2B}$ ,  $-ONR^{2A}R^{2B}$  или  $-NHC(O)NHN R^{2A}R^{2B}$ .  $R^2$  может представлять собой водород, галоген,  $-CF_3$ ,  $-OR^{2A}$  или  $-NR^{2A}R^{2B}$ .  $R^2$  может представлять собой водород.  $R^2$  может представлять собой галоген.  $R^2$  может представлять собой  $-CF_3$ .  $R^2$  может представлять собой  $-OR^{2A}$ .  $R^2$  может представлять собой  $-NR^{2A}R^{2B}$ .  $R^2$  и  $R^3$  могут представлять собой водород.

**[0150]**  $R^2$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный



**[0154]**  $R^2$  может представлять собой замещенный или незамещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.  $R^2$  может представлять собой замещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.  $R^2$  может представлять собой незамещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.  $R^2$  может представлять собой замещенный или незамещенный 3 - 6 членный гетероциклоалкил.  $R^2$  может представлять собой замещенный 3 - 6 членный гетероциклоалкил.  $R^2$  может представлять собой незамещенный 3 - 6 членный гетероциклоалкил.  $R^2$  может представлять собой замещенный или незамещенный 3 членный гетероциклоалкил.  $R^2$  может представлять собой замещенный или незамещенный 4 членный гетероциклоалкил.  $R^2$  может представлять собой 5 членный гетероциклоалкил.  $R^2$  может представлять собой 6 членный гетероциклоалкил.

**[0155]**  $R^2$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 - 8 членный арил.  $R^2$  может представлять собой замещенный 5 - 8 членный арил.  $R^2$  может представлять собой незамещенный 5 - 8 членный арил.  $R^2$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 членный арил.  $R^2$  может представлять собой замещенный 5 членный арил.  $R^2$  может представлять собой незамещенный 5 членный арил.  $R^2$  может представлять собой замещенный 6 членный арил.  $R^2$  может представлять собой незамещенный 6 членный арил (например, фенил).

**[0156]**  $R^2$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^2$  может представлять собой замещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^2$  может представлять собой незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^2$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 членный гетероарил.  $R^2$  может представлять собой замещенный 5 членный арил.  $R^2$  может представлять собой незамещенный 5 членный гетероарил.  $R^2$  может представлять собой замещенный 6 членный арил.  $R^2$  может представлять собой незамещенный 6 членный гетероарил.

**[0157]**  $R^3$  может представлять собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{3A}$ ,  $-OR^{3A}$ ,  $-NR^{3A}R^{3B}$ ,  $-C(O)OR^{3A}$ ,  $-C(O)NR^{3A}R^{3B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{3A}$ ,  $-S(O)_{n3}R^{3A}$ ,  $-S(O)_{n3}OR^{3A}$ ,  $-S(O)_{n3}NR^{3A}R^{3B}$ ,  $-NHNr^{3A}R^{3B}$ ,  $-ONR^{3A}R^{3B}$ , или  $-NHC(O)NHNr^{3A}R^{3B}$ .  $R^3$  может представлять собой водород, галоген,  $-CF_3$ ,  $-OR^{3A}$ , или  $-NR^{3A}R^{3B}$ .  $R^3$  может представлять собой водород.  $R^3$  может представлять собой галоген.  $R^3$  может представлять собой  $-CF_3$ .  $R^3$  может представлять собой  $-OR^{3A}$ .  $R^3$  может представлять собой  $-NR^{3A}R^{3B}$ .  $R^2$  и  $R^3$  могут представлять собой водород.



незамещенный 4 членный циклоалкил.  $R^3$  может представлять собой 5 членный циклоалкил.  $R^3$  может представлять собой 6 членный циклоалкил.

**[0162]**  $R^3$  может представлять собой замещенный или незамещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.  $R^3$  может представлять собой замещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.  $R^3$  может представлять собой незамещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.  $R^3$  может представлять собой замещенный или незамещенный 3 - 6 членный гетероциклоалкил.  $R^3$  может представлять собой замещенный 3 - 6 членный гетероциклоалкил.  $R^3$  может представлять собой незамещенный 3 - 6 членный гетероциклоалкил.  $R^3$  может представлять собой замещенный или незамещенный 3 членный гетероциклоалкил.  $R^3$  может представлять собой замещенный или незамещенный 4 членный гетероциклоалкил.  $R^3$  может представлять собой 5 членный гетероциклоалкил.  $R^3$  может представлять собой 6 членный гетероциклоалкил.

**[0163]**  $R^3$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 - 8 членный арил.  $R^3$  может представлять собой замещенный 5 - 8 членный арил.  $R^3$  может представлять собой незамещенный 5 - 8 членный арил.  $R^3$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 членный арил.  $R^3$  может представлять собой замещенный 5 членный арил.  $R^3$  может представлять собой незамещенный 5 членный арил.  $R^3$  может представлять собой замещенный 6 членный арил.  $R^3$  может представлять собой незамещенный 6 членный арил (например, фенил).

**[0164]**  $R^3$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^3$  может представлять собой замещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^3$  может представлять собой незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^3$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 членный гетероарил.  $R^3$  может представлять собой замещенный 5 членный арил.  $R^3$  может представлять собой незамещенный 5 членный гетероарил.  $R^3$  может представлять собой замещенный 6 членный арил.  $R^3$  может представлять собой незамещенный 6 членный гетероарил.

**[0165]**  $R^4$  может представлять собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{4A}$ ,  $-OR^{4A}$ ,  $-NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-C(O)OR^{4A}$ ,  $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}R^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}OR^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NHN R^{4A}R^{4B}$ ,  $-ONR^{4A}R^{4B}$ , или  $-NHC(O)NHN R^{4A}R^{4B}$ .  $R^4$  может представлять собой водород или галоген.  $R^4$  может представлять собой водород.  $R^4$  может представлять собой галоген.



незамещенный 4 членный циклоалкил.  $R^4$  может представлять собой 5 членный циклоалкил.  $R^4$  может представлять собой 6 членный циклоалкил.

**[0170]**  $R^4$  может представлять собой замещенный или незамещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.  $R^4$  может представлять собой замещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.  $R^4$  может представлять собой незамещенный 3 - 8 членный гетероциклоалкил.  $R^4$  может представлять собой замещенный или незамещенный 3 - 6 членный гетероциклоалкил.  $R^4$  может представлять собой замещенный 3 - 6 членный гетероциклоалкил.  $R^4$  может представлять собой незамещенный 3 - 6 членный гетероциклоалкил.  $R^4$  может представлять собой замещенный или незамещенный 3 членный гетероциклоалкил.  $R^4$  может представлять собой замещенный или незамещенный 4 членный гетероциклоалкил.  $R^4$  может представлять собой 5 членный гетероциклоалкил.  $R^4$  может представлять собой 6 членный гетероциклоалкил.

**[0171]**  $R^4$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 - 8 членный арил.  $R^4$  может представлять собой замещенный 5 - 8 членный арил.  $R^4$  может представлять собой незамещенный 5 - 8 членный арил.  $R^4$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 членный арил.  $R^4$  может представлять собой замещенный 5 членный арил.  $R^4$  может представлять собой незамещенный 5 членный арил.  $R^4$  может представлять собой замещенный 6 членный арил.  $R^4$  может представлять собой незамещенный 6 членный арил (например, фенил).

**[0172]**  $R^4$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^4$  может представлять собой замещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^4$  может представлять собой незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^4$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 членный гетероарил.  $R^4$  может представлять собой замещенный 5 членный арил.  $R^4$  может представлять собой незамещенный 5 членный гетероарил.  $R^4$  может представлять собой замещенный 6 членный арил.  $R^4$  может представлять собой незамещенный 6 членный гетероарил.

**[0173]**  $R^5$  может представлять собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{5A}$ ,  $-OR^{5A}$ ,  $-NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-C(O)OR^{5A}$ ,  $-C(O)NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}R^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}OR^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NHNR^{5A}R^{5B}$ ,  $-ONR^{5A}R^{5B}$  или  $-NHC(O)NHNR^{5A}R^{5B}$ .

**[0174]**  $R^5$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный







необязательно могут объединяться с образованием  $R^{5A}$ -замещенного или незамещенного 5 членного циклоалкила.  $R^5$  и  $R^6$  необязательно могут объединяться с образованием  $R^{5A}$ -замещенного 5 членного циклоалкила.  $R^5$  и  $R^6$  необязательно могут объединяться с образованием незамещенного 5 членного циклоалкила.  $R^5$  и  $R^6$  необязательно могут объединяться с образованием  $R^{5A}$ -замещенного или незамещенного 6 членного циклоалкила.  $R^5$  и  $R^6$  необязательно могут объединяться с образованием  $R^{5A}$ -замещенного 6 членного циклоалкила.  $R^5$  и  $R^6$  необязательно могут объединяться с образованием незамещенного 6 членного циклоалкила.

**[0183]**  $R^5$  и  $R^6$  могут независимо представлять собой незамещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил.  $R^5$  и  $R^6$  могут независимо представлять собой незамещенный  $C_1$ - $C_4$  алкил.  $R^5$  и  $R^6$  могут независимо представлять собой метил, этил или пропил.  $R^5$  и  $R^6$  могут независимо представлять собой метил. Когда  $R^5$  представляет собой метил или пропил,  $R^6$  может представлять собой метил.

**[0184]**  $R^6$  может представлять собой незамещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил.  $R^6$  может представлять собой незамещенный  $C_1$ - $C_5$  алкил.  $R^6$  может представлять собой незамещенный  $C_1$ - $C_4$  алкил.  $R^6$  может представлять собой незамещенный  $C_1$ - $C_3$  алкил.  $R^6$  может представлять собой метил, этил или пропил.  $R^6$  может представлять собой метил.  $R^6$  может представлять собой этил.  $R^6$  может представлять собой пропил.  $R^6$  может представлять собой метил и  $R^5$  может представлять собой метил, этил или пропил.  $R^6$  может представлять собой метил и  $R^5$  может представлять собой метил.  $R^6$  может представлять собой метил и  $R^5$  может представлять собой этил.  $R^6$  может представлять собой метил и  $R^5$  может представлять собой пропил.  $R^6$  может представлять собой галоген.

**[0185]**  $R^6$  может описываться как в данном документе и присоединяться к углероду, имеющему (*R*) стереохимию.  $R^6$  может представлять собой (*R*)- $C_1$ - $C_6$  алкил.  $R^6$  может представлять собой (*R*)- $C_1$ - $C_5$  алкил.  $R^6$  может представлять собой (*R*)- $C_1$ - $C_4$  алкил.  $R^6$  может представлять собой (*R*)- $C_1$ - $C_3$  алкил.  $R^6$  может представлять собой (*R*)-метил.  $R^6$  может представлять собой (*R*)-этил.  $R^6$  может представлять собой (*R*)-пропил.

**[0186]**  $R^6$  может быть таким, как описано в данном документе и присоединяться к углероду, имеющему (*S*) стереохимию.  $R^6$  может представлять собой (*S*)- $C_1$ - $C_6$  алкил.  $R^6$  может представлять собой (*S*)- $C_1$ - $C_5$  алкил.  $R^6$  может представлять собой (*S*)- $C_1$ - $C_4$  алкил.  $R^6$  может представлять собой (*S*)- $C_1$ - $C_3$  алкил.  $R^6$  может представлять собой (*S*)-метил.  $R^6$

может представлять собой (*S*)-этил.  $R^6$  может представлять собой (*S*)-пропил. Когда  $R^5$  представляет собой метил или пропил,  $R^6$  может представлять собой (*R*)-метил.

**[0187]**  $R^7$  может представлять собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{7A}$ ,  $-OR^{7A}$ ,  $-NR^{7A}R^{7B}$ ,  $-C(O)OR^{7A}$ ,  $-C(O)NR^{7A}R^{7B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{7A}$ ,  $-S(O)_{n7}R^{7A}$ ,  $-S(O)_{n7}OR^{7A}$ ,  $-S(O)_{n7}NR^{7A}R^{7B}$ ,  $-NHNr^{7A}R^{7B}$ ,  $-ONR^{7A}R^{7B}$  или  $-NHC(O)NHNr^{7A}R^{7B}$ .  $R^7$  может представлять собой водород, галоген,  $-CF_3$ ,  $-OR^{7A}$  или  $-NR^{7A}R^{7B}$ .  $R^7$  может представлять собой водород.  $R^7$  может представлять собой галоген.  $R^7$  может представлять собой  $-CF_3$ .  $R^7$  может представлять собой  $-OR^{7A}$ .  $R^7$  может представлять собой  $-NR^{7A}R^{7B}$ .

**[0188]**  $R^7$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0189]**  $R^7$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил.  $R^7$  может представлять собой незамещенный алкил.  $R^7$  может представлять собой замещенный алкил.  $R^7$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1$ - $C_{20}$  алкил.  $R^7$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1$ - $C_{10}$  алкил.  $R^7$  может представлять собой замещенный  $C_1$ - $C_{10}$  алкил.  $R^7$  может представлять собой незамещенный  $C_1$ - $C_{10}$  алкил.  $R^7$  может представлять собой  $C_1$ - $C_5$  замещенный или незамещенный алкил.  $R^7$  может представлять собой замещенный  $C_1$ - $C_5$  алкил.  $R^7$  может представлять собой незамещенный  $C_1$ - $C_5$  алкил.  $R^7$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1$ - $C_3$  алкил.  $R^7$  может представлять собой незамещенный  $C_1$ - $C_3$  алкил.  $R^7$  может представлять собой насыщенной  $C_1$ - $C_3$  алкил.  $R^7$  может представлять собой метил.  $R^7$  может представлять собой этил.  $R^7$  может представлять собой пропил.

**[0190]**  $R^7$  может представлять собой замещенный или незамещенный гетероалкил.  $R^2$  может представлять собой замещенный гетероалкил.  $R^7$  может представлять собой незамещенный алкил.  $R^7$  может представлять собой замещенный или незамещенный 2 - 10 членный гетероалкил.  $R^7$  может представлять собой замещенный 2 - 10 членный гетероалкил.  $R^7$  может представлять собой незамещенный 2 - 10 членный гетероалкил.  $R^7$  может представлять собой 2 - 6 членный гетероалкил.  $R^7$  может представлять собой замещенный 2 - 6 членный гетероалкил.  $R^7$  может представлять собой незамещенный 2 - 6 членный гетероалкил.



членный гетероарил.  $R^7$  может представлять собой замещенный 6 членный арил.  $R^7$  может представлять собой незамещенный 6 членный гетероарил.

**[0195]** Y может представлять собой N. Y может представлять собой  $C(R^8)$ . Z может представлять собой N. Z может представлять собой  $C(R^9)$ . Y и Z может представлять собой N. Y может представлять собой  $C(R^8)$ , где  $R^8$  является таким, как описано в данном документе, и Z может представлять собой  $C(R^9)$ , где  $R^9$  является таким, как описано в данном документе. Y может представлять собой  $C(R^8)$ , где  $R^8$  является таким, как описано в данном документе, и Z может представлять собой  $C(R^9)$ , где  $R^9$  независимо представляет собой водород. Y может представлять собой N, и Z может представлять собой  $C(R^9)$ , где  $R^9$  является таким, как описано в данном документе. Y может представлять собой N, и Z может представлять собой  $C(R^9)$ , где  $R^9$  независимо представляет собой водород.

**[0196]** X может представлять собой  $-CH_2$ . X может представлять собой O,  $N(R^{10})$  или S, где  $R^{10}$  является таким, как описано в данном документе. X может представлять собой  $S(O)$  или  $S(O)_2$ . X может представлять собой S. X может представлять собой O. X может представлять собой  $N(R^{10})$ , где  $R^{10}$  является таким, как описано в данном документе.

**[0197]**  $R^{10}$  может представлять собой водород.  $R^{10}$  может представлять собой  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$ ,  $-C_3H_7$ ,  $-CH_2C_6H_5$ .  $R^{10}$  может представлять собой водород или метил.  $R^{10}$  может представлять собой водород или  $-C_2H_5$ .  $R^{10}$  может представлять собой водород или  $-C_3H_7$ .  $R^{10}$  может представлять собой водород или  $-CH_2C_6H_5$ .  $R^{10}$  может представлять собой  $-CH_3$ .  $R^{10}$  может представлять собой  $-C_2H_5$ .  $R^{10}$  может представлять собой  $-C_3H_7$ .  $R^{10}$  может представлять собой  $-CH_2C_6H_5$ .

**[0198]**  $R^8$  может представлять собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{8A}$ ,  $-OR^{8A}$ ,  $-O-L^{8A}-R^{8C}$ ,  $-NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-C(O)OR^{8A}$ ,  $-C(O)NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{8A}$ ,  $-S(O)_nR^{8A}$ ,  $-S(O)_nOR^{8A}$ ,  $-S(O)_nNR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NHN R^{8A}R^{8B}$ ,  $-ONR^{8A}R^{8B}$ , или  $-NHC(O)NHN R^{8A}R^{8B}$ .  $R^8$  может представлять собой водород, галоген,  $-OR^{8A}$ .  $R^8$  может представлять собой водород.  $R^8$  может представлять собой галоген.  $R^8$  может представлять собой  $-OR^{8A}$ .  $R^{8A}$  является таким, как описано в данном документе.

**[0199]**  $R^8$  может представлять собой водород, галоген,  $-OR^{8A}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

[0200]  $R^8$  может представлять собой  $-OR^{8A}$ , где  $R^{8A}$  является таким, как описано в данном документе.  $R^8$  может представлять собой  $-OR^{8A}$ , где  $R^{8A}$  представляет собой водород, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.  $R^8$  может представлять собой  $-OR^{8A}$ , где  $R^{8A}$  представляет собой замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.

[0201]  $R^8$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

[0202]  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный алкил,  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный гетероалкил,  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный циклоалкил,  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный арил, или  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный гетероарил.

[0203]  $R^8$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил.  $R^8$  может представлять собой замещенный алкил.  $R^8$  может представлять собой незамещенный алкил.  $R^8$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_{20}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой замещенный  $C_1-C_{20}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_{20}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_{10}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой замещенный  $C_1-C_{10}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_{10}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_5$  алкил.  $R^8$  может представлять собой замещенный  $C_1-C_5$  алкил.  $R^8$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_5$  алкил.  $R^8$  может представлять собой метил.  $R^8$  может представлять собой этил.  $R^8$  может представлять собой пропил.

[0204]  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный алкил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный алкил.  $R^8$  может представлять собой незамещенный алкил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный  $C_1-C_{20}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный  $C_1-C_{20}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_{20}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный  $C_1-C_{10}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный  $C_1-C_{10}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_{10}$  алкил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный  $C_1-C_5$  алкил.  $R^8$  может









гетероарил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^8$  может представлять собой незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный 5 или 6 членный гетероарил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный 5 или 6 членный гетероарил.  $R^8$  может представлять собой незамещенный 5 или 6 членный гетероарил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный 5 членный гетероарил.  $R^8$  может представлять собой  $R^{8A}$ -замещенный или незамещенный 6 членный гетероарил.

**[0215]**  $R^8$  может представлять собой  $-O-L^{8A}-R^{8A}$ .  $L^{8A}$  представляет собой замещенный или незамещенный алкилен или замещенный или незамещенный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_{20}$  алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_{10}$  алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_5$  алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный  $C_1-C_{20}$  алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_{20}$  алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный  $C_1-C_{10}$  алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_{10}$  алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный  $C_1-C_5$  алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_5$  алкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой  $-(CH_2)_m-R^{8A}$ , где  $m$  представляет собой целое число 1, 2, 3, 4 или 5.

**[0216]**  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный или незамещенный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой незамещенный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный или незамещенный 2 - 20 членный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный 2 - 20 членный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный или незамещенный 2 - 10 членный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный 2 - 10 членный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой незамещенный 2 - 10 членный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный или незамещенный 2 - 6 членный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой замещенный 2 - 6 членный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой незамещенный 2 - 6 членный гетероалкилен.  $L^{8A}$  может представлять собой  $-(CH_2CH_2O)_{m1}-R^{8A}$ , где  $m1$  представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3 или 4.

**[0217]**  $R^8$  может представлять собой  $-O-L^{8A}-N(R^{8C})-S(O)_{n8}-R^{8A}$ , где  $R^{8A}$  является таким, как описано в данном документе.  $R^8$  может представлять собой  $-O-L^{8A}-N(R^{8C})-S(O)_{n8}-R^{8A}$ , где  $R^{8A}$  представляет собой водород или замещенный или незамещенный алкил (например,  $C_1-C_5$  алкил).

**[0218]**  $R^{8A}$  представляет собой водород, галоген, оксо,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OR^{15}$ ,  $-N(R^{15,1})(R^{15,2})$ ,  $-COOR^{15}$ ,  $-CON(R^{15,1})(R^{15,2})$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{15}$ ,  $-S(O)_2R^{15}$ ,  $-S(O)_3R^{15}$ ,  $-S(O)_4R^{15}$ ,  $-S(O)_2N(R^{15,1})(R^{15,2})$ ,  $-NHN(R^{15,1})(R^{15,2})$ ,  $-ON(R^{15,1})(R^{15,2})$ ,  $-NHC(O)NHN(R^{15,1})(R^{15,2})$ ,  $-NHC(O)N(R^{15,1})(R^{15,2})$ ,  $-NHS(O)_2R^{15}$ ,  $-NHC(O)R^{15}$ ,  $-NHC(O)-OR^{15}$ ,  $-NHOR^{15}$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ ,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный алкил,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный гетероалкил,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный циклоалкил,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный арил, или  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный гетероарил.

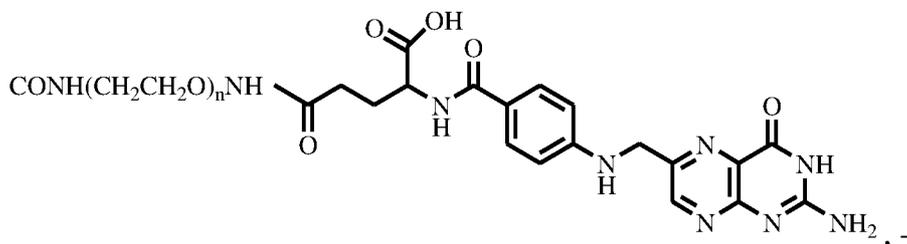
**[0219]**  $R^{15}$ ,  $R^{15,1}$  и  $R^{15,2}$  независимо представляют собой водород, галоген, оксо,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-S(O)_2Cl$ ,  $-S(O)_3H$ ,  $-S(O)_4H$ ,  $-S(O)_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-NHS(O)_2H$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ ,  $R^{16}$ -замещенный или незамещенный алкил,  $R^{16}$ -замещенный или незамещенный гетероалкил,  $R^{16}$ -замещенный или незамещенный циклоалкил,  $R^{16}$ -замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,  $R^{16}$ -замещенный или незамещенный арил, или  $R^{16}$ -замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0220]**  $R^{16}$  представляет собой водород, галоген, оксо,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SH$ ,  $-S(O)_2Cl$ ,  $-S(O)_3H$ ,  $-S(O)_4H$ ,  $-S(O)_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-NHS(O)_2H$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ , незамещенный алкил, незамещенный гетероалкил, незамещенный циклоалкил, незамещенный гетероциклоалкил, незамещенный арил, или незамещенный гетероарил.

**[0221]**  $R^{8C}$  может представлять собой водород, галоген, оксо,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-S(O)_2Cl$ ,  $-S(O)_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-NHS(O)_2H$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный алкил,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный гетероалкил,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный циклоалкил,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный гетероциклоалкил,  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный арил, или  $R^{15}$ -замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0222]**  $R^8$  может представлять собой водород, галоген,  $-OR^{8A}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.  $R^8$  может представлять собой  $-OR^{8A}$ , где  $R^{8A}$  представляет собой водород, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.  $R^{8A}$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.

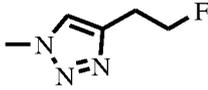
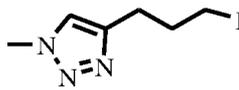
**[0223]**  $R^{8A}$  может представлять собой  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$ ,  $-CD_3$ ,  $-CD_2CD_3$ ,  $-(CH_2)_2OH$ ,  $-(CH_2CH_2)_3OH$ ,  $-CH_2C(CH_3)_2OH$ ,  $-(CH_2)_2C(CH_3)_2OH$ ,  $-(CH_2)_2F$ ,  $-(CH_2)_3F$ ,  $-CH_2C(CH_3)_2F$ ,



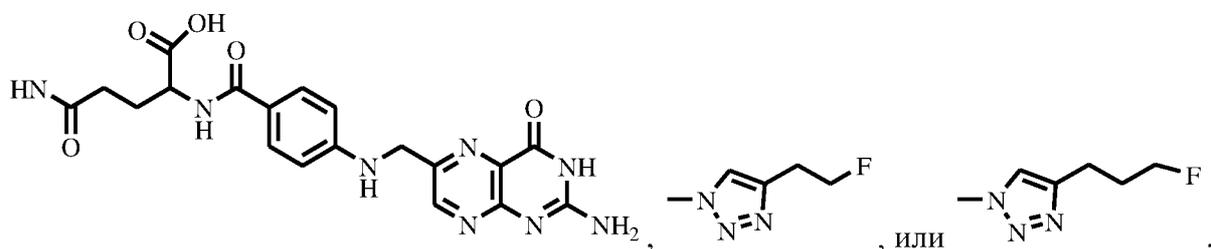
$(CH_2)_2C(CH_3)_2F$ ,

$(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-G^{8A}$ , или  $-CO(CH_2)_2COO(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-G^{8B}$ , где  $n$  представляет собой 2 – 20.

$G^{8A}$  представляет собой  $H$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCF_3$ ,  $F$ ,  $Cl$ ,  $N_3$ ,  $-NHCH_2C_6H_4NO_2$ ,

$NHCH_2C_6H_4F$ ,  $NHCH_2C_6H_4NO_2$ ,  $-NHCH_2C_6H_4F$ , , или  ;

$G^{8B}$  представляет собой  $H$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-OCH_3$ ,  $F$ ,  $Cl$ ,



**[0224]**  $R^{8A}$  может представлять собой  $-(CH_2)_2NHSO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_2F$ ,  $-(CH_2)_3F$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nF$ , или  $-(CH_2CH_2O)_nCH_3$ , где  $n$  представляет собой от 2 до 5.

**[0225]**  $R^{1A}$  и  $R^{8A}$  могут независимо представлять собой замещенный или незамещенный алкил или замещенный или незамещенный гетероалкил, как описано в данном документе.  $R^{1A}$  может представлять собой  $-O-L^{1A}-R^{1A}$ , где  $L^{1A}$  является таким, как описано в данном документе, и  $R^{8A}$  может представлять собой  $-O-L^{8A}-R^{8A}$ , где  $L^{8A}$  является таким, как

описано в данном документе.  $L^{1A}$  могут независимо представлять собой  $-(CH_2)_m-R^{1A}$ , и  $L^{8A}$  может представлять собой  $-(CH_2)_m-R^{8A}$ , где  $R^{1A}$ ,  $R^{8A}$  и  $m$  являются такими, как описано в данном документе.  $L^{1A}$  может представлять собой  $-(CH_2CH_2O)_{m1}-R^{1A}$ , и  $L^{8A}$  может представлять собой  $-(CH_2CH_2O)_{m1}-R^{8A}$ , где  $R^{1A}$ ,  $R^{8A}$  и  $m$  являются такими, как описано в данном документе. Символ  $m$  может независимо представлять собой 1, 2 или 3. Символ  $m1$  может независимо представлять собой 1, 2, 3, или 4.

**[0226]**  $R^1$  может представлять собой  $-O-L^{1A}-N(R^{1C})-S(O)_{n1}-R^{1A}$ , как описано в данном документе, и  $R^{8A}$  может представлять собой  $OR^{8A}$ , где  $R^{8A}$  представляет собой замещенный или незамещенный алкил.  $R^1$  может представлять собой  $-O-L^{1A}-N(R^{1C})-S(O)_{n1}-R^{1A}$ , как описано в данном документе, и  $R^{8A}$  может представлять собой  $-OR^{8A}$ , где  $R^{8A}$  представляет собой незамещенный  $C_1-C_3$  алкил.

**[0227]**  $R^9$  может представлять собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{9A}$ ,  $-OR^{9A}$ ,  $-NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-C(O)OR^{9A}$ ,  $-C(O)NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}R^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}OR^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NHN R^{9A}R^{9B}$ ,  $-ONR^{9A}R^{9B}$ , или  $-NHC(O)NHN R^{9A}R^{9B}$ .  $R^9$  может представлять собой водород, галоген,  $-CF_3$ ,  $-OR^{9A}$ , или  $-NR^{9A}R^{9B}$ .  $R^9$  может представлять собой водород.  $R^9$  может представлять собой галоген.  $R^9$  может представлять собой  $-CF_3$ .  $R^9$  может представлять собой  $-OR^{9A}$ .  $R^9$  может представлять собой  $-NR^{9A}R^{9B}$ .

**[0228]**  $R^9$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0229]**  $R^9$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил.  $R^9$  может представлять собой незамещенный алкил.  $R^9$  может представлять собой замещенный алкил.  $R^9$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_{20}$  алкил.  $R^9$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_{10}$  алкил.  $R^9$  может представлять собой замещенный  $C_1-C_{10}$  алкил.  $R^9$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_{10}$  алкил.  $R^9$  может представлять собой  $C_1-C_5$  замещенный или незамещенный алкил.  $R^9$  может представлять собой замещенный  $C_1-C_5$  алкил.  $R^9$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_5$  алкил.  $R^9$  может представлять собой замещенный или незамещенный  $C_1-C_3$  алкил.  $R^9$  может представлять собой незамещенный  $C_1-C_3$  алкил.  $R^9$  может представлять собой насыщенной  $C_1-C_3$  алкил.  $R^9$  может

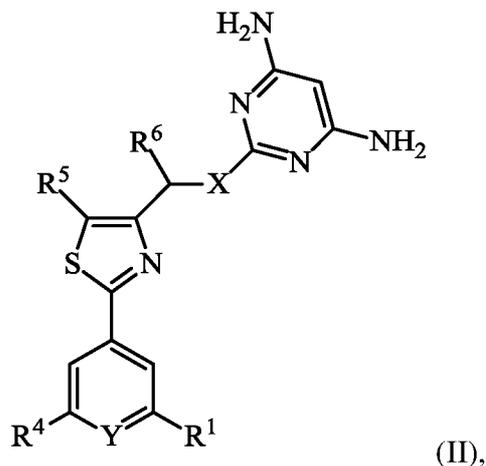


замещенный или незамещенный 5 членный арил.  $R^9$  может представлять собой замещенный 5 членный арил.  $R^9$  может представлять собой незамещенный 5 членный арил.  $R^9$  может представлять собой замещенный 6 членный арил.  $R^9$  может представлять собой незамещенный 6 членный арил (например, фенил).

**[0234]**  $R^9$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^9$  может представлять собой замещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^9$  может представлять собой незамещенный 5 - 8 членный гетероарил.  $R^9$  может представлять собой замещенный или незамещенный 5 членный гетероарил.  $R^9$  может представлять собой замещенный 5 членный арил.  $R^9$  может представлять собой незамещенный 5 членный гетероарил.  $R^9$  может представлять собой замещенный 6 членный арил.  $R^9$  может представлять собой незамещенный 6 членный гетероарил.

**[0235]**  $R^{1B}$ ,  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{7A}$ ,  $R^{7B}$ ,  $R^{8B}$ ,  $R^{9A}$  и  $R^{9B}$ , могут независимо представлять собой водород, галоген, или замещенный или незамещенный алкил.

**[0236]** Соединение формулы (I) может иметь формулу:

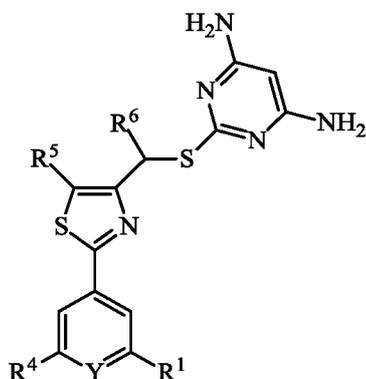


где  $R^1$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $Y$  и  $X$  являются такими, как описано в данном документе.

**[0237]** В соединении формулы (II),  $R^4$  может представлять собой водород или галоген. В соединении формулы (II),  $R^5$  может представлять собой замещенный или незамещенный алкил.  $R^5$  может представлять собой  $C_1$ - $C_5$  незамещенный алкил.  $R^5$  может представлять собой метил.  $R^5$  может представлять собой этил.  $R^5$  может представлять собой пропил.  $R^6$

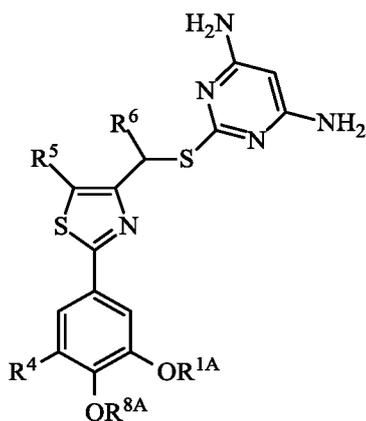
может представлять собой C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> незамещенный алкил. R<sup>6</sup> может представлять собой метил. R<sup>6</sup> может представлять собой этил. R<sup>6</sup> может представлять собой пропил.

[0238] Соединение формулы (I) может иметь формулу:



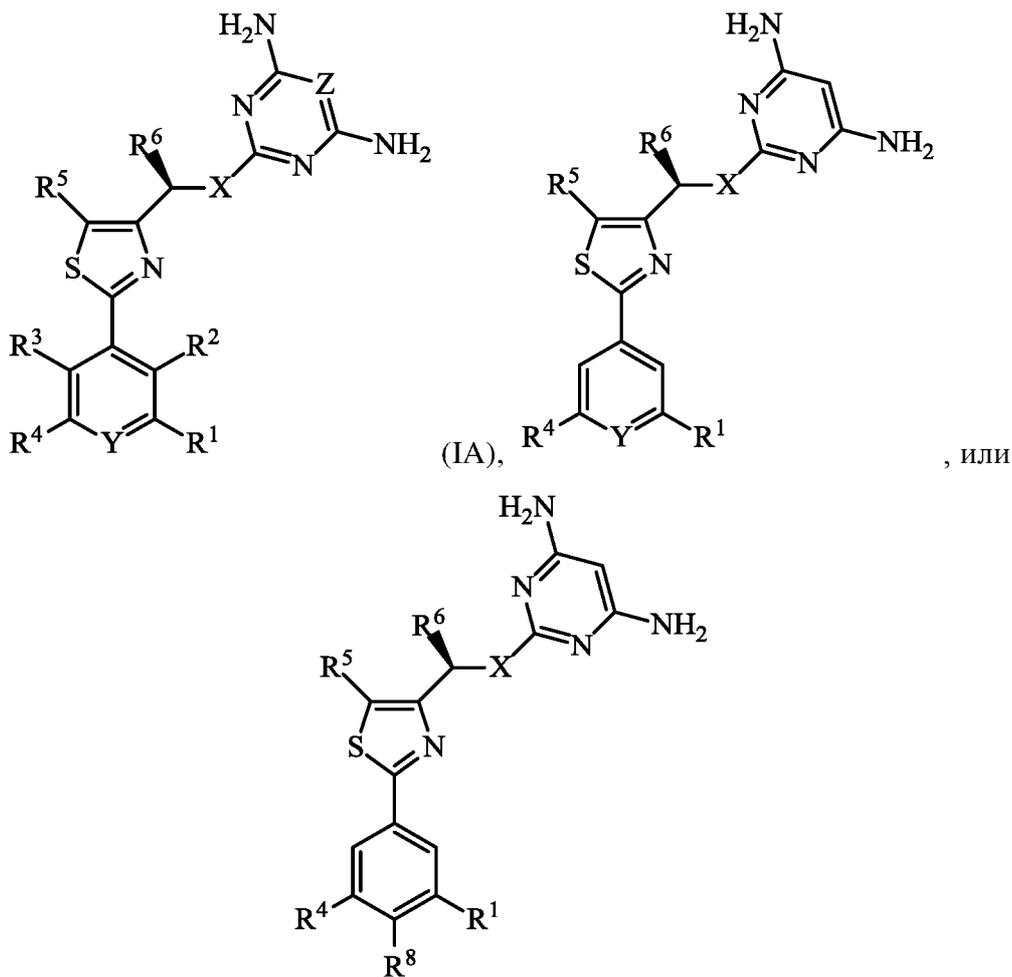
Y, R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> являются такими, как описано в данном документе.

[0239] Соединение формулы (I) может иметь формулу:



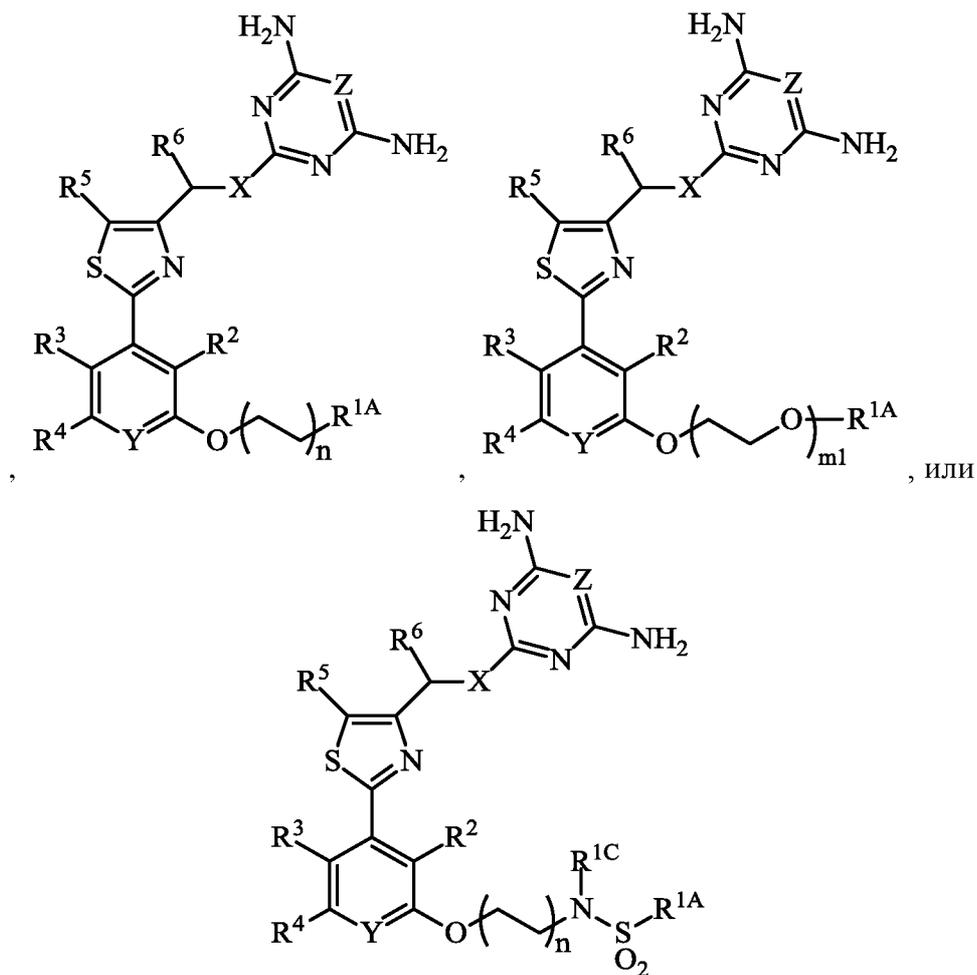
R<sup>1A</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> и R<sup>8A</sup> являются такими, как описано в данном документе.

[0240] Соединение формулы (I) может иметь формулу:



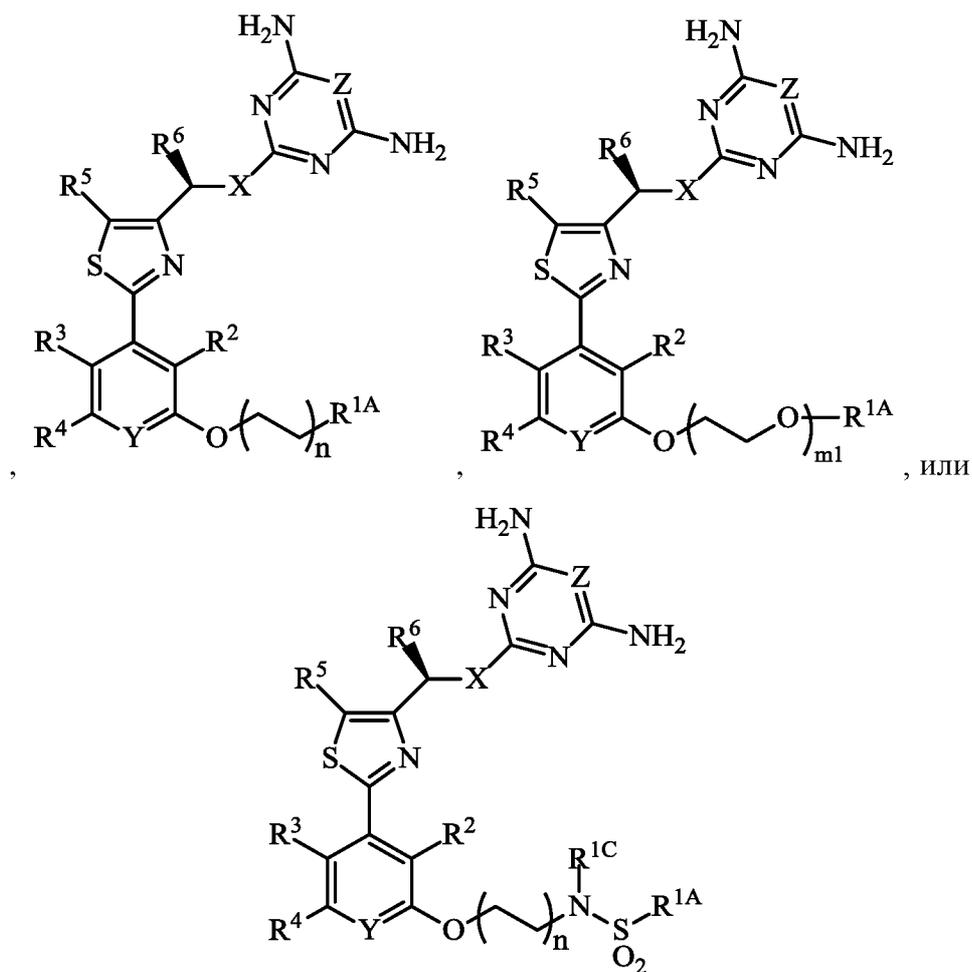
**[0241]** Y, R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> являются такими, как описано в данном документе. R<sup>1</sup> может представлять собой -OR<sup>1A</sup>, где R<sup>1A</sup> представляет собой -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>F, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, и символ n представляет собой от 2 до 5. R<sup>4</sup> может представлять собой водород или галоген. R<sup>5</sup> может представлять собой метил или пропил. R<sup>6</sup> может представлять собой метил. R<sup>8</sup> может представлять собой -OR<sup>8A</sup>, где R<sup>8A</sup> может представлять собой -OCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>F, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>F, или -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, где n представляет собой от 2 до 5.

**[0242]** Соединение формулы (I) может иметь формулу



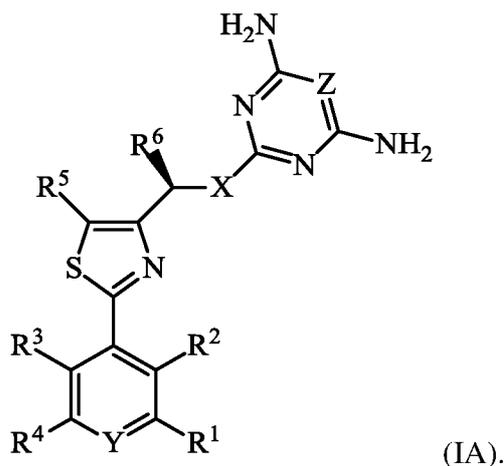
X, Y, Z, R<sup>1</sup>, R<sup>1A</sup>, R<sup>1C</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> и R<sup>8A</sup> являются такими, как описано в данном документе. Символ n и m1 могут независимо представлять собой 1, 2, 3 или 4. R<sup>1A</sup> может представлять собой незамещенный алкил. R<sup>1A</sup> может представлять собой метил. R<sup>1A</sup> может представлять собой водород. R<sup>5</sup> может представлять собой метил, этил или пропил, и R<sup>6</sup> может представлять собой метил.

**[0243]** Соединение формулы (I) может иметь формулу

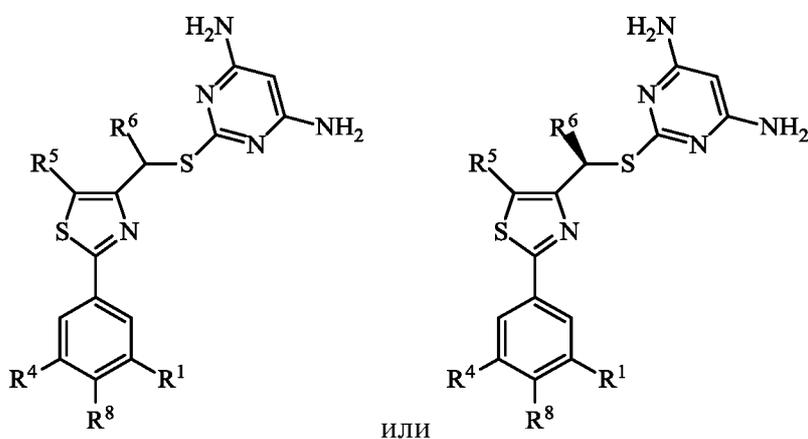


X, Y, Z, R<sup>1</sup>, R<sup>1A</sup>, R<sup>1C</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> и R<sup>8A</sup> являются такими, как описано в данном документе. Символ n и m1 могут независимо представлять собой 1, 2, 3 или 4. R<sup>1A</sup> может представлять собой незамещенный алкил. R<sup>1A</sup> может представлять собой метил. R<sup>1A</sup> может представлять собой водород. R<sup>5</sup> может представлять собой метил, этил или пропил, и R<sup>6</sup> может представлять собой метил.

**[0244]** Соединение формулы (I) может иметь формулу:



[0245] Соединение формулы (I) может иметь формулу:



## II. Фармацевтические композиции

[0246] Кроме того, представленными в данном документе являются фармацевтические препараты. В одном аспекте фармацевтическая композиция является такой, что включает соединение, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

### 1. Препараты

[0247] Фармацевтическая композиция может быть получена и введена в самые разнообразные дозированные препараты. Соединения, описанные могут вводиться перорально, ректально или инъекционно (например, внутривенно, внутримышечно, внутривожно, подкожно, внутривагинально или внутривентриально).

[0248] Для получения фармацевтических композиций из соединений, описанных в данном документе, фармацевтически приемлемые носители могут быть либо твердыми, либо жидкими. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, саше, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердый носитель может

представлять собой одно или больше вещества, которое может также действовать как разбавители, ароматизаторы, связующие вещества, консерванты, дезинтегрирующие таблетки агенты или инкапсулирующий материал.

**[0249]** В порошках, носитель может представлять собой а тонко измельченное твердое вещество в смеси с тонко измельченным активным компонентом. В таблетках, активные компонент может быть смешан с носителем, обладающим необходимыми связующими свойствами, в приемлемых количественных соотношениях и спрессован в желаемую форму и желаемого размера.

**[0250]** Порошки и таблетки предпочтительно содержат от 5 % до 70 % активного соединения. Приемлемыми носителями являются карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактоза, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, легкоплавкий воск, масло какао и тому подобное. Термин “препарат” предназначен, чтобы включать активное соединения с инкапсулирующим материалом как носителем обеспечивающим капсулу, в которой активные компонент с или без других носителей, окружен носителем, который, таким образом, находится в сочетании с ним. Аналогичным образом, включены являются саше и пастилки. Таблетки, порошки, капсулы, пилюли, саше и пастилки могут быть использованы в качестве твердых дозированных форм, приемлемых для перорального введения.

**[0251]** Для получения суппозитории, легкоплавкий воск, такой как смесь глицеридов жирных кислот или масло какао, сначала расплавляют, и в нем с перемешиванием гомогенно диспергируют активные компонент. Расплавленную гомогенную смесь затем выливают в формы подходящего размера, дают остыть и, тем самым, затвердеть.

**[0252]** Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например, водные растворы или растворы вода/пропиленгликоль. Для парентерального введения, жидкие препараты могут быть сформулированы в виде раствора в водный раствор полиэтиленгликоля.

**[0253]** Водные растворы приемлемые для перорального применения, могут быть получены путем растворения активного компонента в воде и добавления приемлемых красителей, ароматизаторов, стабилизаторов и загустителей по желанию. Водные суспензии приемлемые для перорального применения могут быть приготовлены путем диспергирования тонко измельченного активного компонента в воде с вязким материалом,

таким как природные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза и другие хорошо известные суспендирующие агенты.

**[0254]** Кроме того, включенными являются препараты в твердой форме, которые предназначены для превращения, незадолго до использования, в препараты в жидкой форме для перорально введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии. Данные препараты могут содержать, в дополнение к активному компоненту, красители, ароматизаторы, стабилизаторы, буферы, искусственные и природные подсластители, диспергаторы, загустители, солюбилизующие агенты и тому подобное.

**[0255]** Фармацевтический препарат предпочтительно находится в единичной дозированной форме. В такой форме препарат подразделяется на единичные дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Единичная дозированная форма может представлять собой упакованный препарат, причем упаковка содержит дискретные количества препарата, такие как упакованные таблетки, капсулы и порошки во флаконах или ампулах. Кроме того, единичная дозированная форма может представлять собой собственно капсулу, таблетку, саше или пастилку, или она может представлять собой соответствующее количество какой-либо из данных в упакованной форме.

**[0256]** Количество активного компонента в единичном дозированном препарате может варьировать или регулироваться от 0,1 мг до 10000 мг в зависимости от конкретного применения и эффективности активного компонента. Композиция может, если необходимо, также содержать другие совместимые терапевтические агенты.

**[0257]** Некоторые соединения могут иметь ограниченную растворимость в воде и, следовательно, могут потребовать поверхностно-активное вещество или другой соответствующий сорастворитель в композиции. Такие сорастворители включают: полисорбат 20, 60 и 80; плуроник F-68, F-84 и P-103; циклодекстрин; и полиоксил 35 касторовое масло. Такие сорастворители, как правило, применяют в количестве от примерно 0,01 % до примерно 2 % по массе. Более высокая вязкость, чем у простых водных растворов, может быть желательной, чтобы уменьшить вариабельность дозирования препаратов, чтобы уменьшить физическое разделение компонентов суспензии или эмульсии препарата, и/или иным образом улучшить препарат. Такие формирующий вязкость агенты включают, например, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу,

гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, сульфат хондроитина и их соли, гиалуроновую кислоту и ее соли, и комбинации указанных выше. Такие агенты, как правило, применяют в количестве от примерно 0,01 % до примерно 2 % по массе.

**[0258]** Фармацевтические композиции могут дополнительно включать компоненты, чтобы обеспечить замедленное высвобождение и/или содействие. Такие компоненты включают высокомолекулярные, анионные полимеры-мукомиметики, желирующие полисахариды и мелкодисперсные субстраты носителя лекарственного средства. Данные компоненты обсуждаются более подробно в патентах США № 4911920; 5403841; 5212162; и 4861760. Полные содержания данных патентов включены в данном документе в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей.

**[0259]** Фармацевтическая композиция может быть предназначена для внутривенного применения. Фармацевтически приемлемый эксципиент может включать буферы для регулирования pH до требуемого диапазона для внутривенного применения. Многие буферы, включая соли неорганических кислот, такие как фосфат, борат и сульфат, известны.

## **2. Эффективные дозировки**

**[0260]** Фармацевтическая композиция может включать композиции, в которых активный ингредиент содержится в терапевтически эффективном количестве, т.е., в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. Фактическое количество, эффективное для конкретного применения будет зависеть, в том числе, от состояния, подлежащего лечению.

**[0261]** Дозировка и частота (одна или нескольких доз) вводимых соединений может варьировать в зависимости от целого ряда факторов, включая путь введения; размер, возраст, пол, состояние здоровья, массу тела, индекс массы тела и диету реципиента; характер и степень выраженности симптомов заболевания, подлежащего лечению; наличие других заболеваний или других проблем, связанных со здоровьем; вид сопутствующего лечения; и осложнения от какого-либо заболевания или схемы лечения. Другие терапевтические схемы лечения или агенты могут быть использованы в сочетании со способами и соединениями, раскрытыми в данном документе.

**[0262]** . Для соединений, описанных в данном документе, терапевтически эффективные количества первоначально могут быть определены из анализов клеточных культур. Целевые концентрации будут такими концентрациями активного(ых) соединения(й), которые способны повысить степень смерти раковых клеток, как измерено, например, используя способы, известные в данной области.

**[0263]** Терапевтически эффективные количества для использования у людей может быть определена из моделей на животных. Например, доза для людей может быть сформулирована для достижения концентрации, которая, как обнаружено, является эффективной у животных. Дозировку для людей могут регулировать путем мониторинга ответа рака на лечение и регулировать дозировку повышением или понижением, как описано выше.

**[0264]** Дозировки могут варьировать в зависимости от потребностей субъекта и используемого соединения. Доза, вводимая субъекту, в контексте фармацевтических композиций, представленных в данном документе, должно быть достаточной для реализации изобретения благоприятного терапевтического ответа у субъекта с течением времени. Размер дозы также будет определяться существованием, природой и степенью каких-либо неблагоприятных побочных эффектов. Как правило, лечение начинают с более низких дозировок, которые меньше, чем оптимальная доза соединения. Впоследствии, дозу увеличивают небольшими шагами, пока при данных обстоятельствах не достигается оптимального эффекта.

**[0265]** Количества и интервалы дозирования могут регулироваться индивидуально, чтобы обеспечить уровни вводимых соединений, эффективные для конкретного клинического показания подвергаемого лечению. Это обеспечит схему терапевтического лечения, которая соответствует тяжести болезненного состояния индивидуума.

**[0266]** Используя принципы, представленные в данном документе, эффективная профилактическая или терапевтическая схема лечения может быть спланирована так, что не вызывает существенной токсичности и еще является вполне эффективной для лечения клинических симптомов, продемонстрированных конкретным пациентом. Это планирование должно включать тщательный выбор активного соединения, принимая во внимание факторы, такие как эффективность соединения, относительная биодоступность, масса тела пациента, наличие и тяжесть нежелательных побочных эффектов, предпочтительный способ введения и профиль токсичности выбранного агента.

### 3. Токсичность

[0267] Соотношение между токсичностью и терапевтическим эффектом для конкретного соединения является его терапевтическим индексом и может быть выражен как отношение между  $LD_{50}$  (количеством соединения, летальным в 50 % популяции) и  $ED_{50}$  (количеством соединения, эффективным в 50 % популяции). Соединения, которые демонстрируют высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. Данные терапевтического индекса, полученные из анализов на культурах клеток и/или исследований на животных могут быть использованы при формулировании диапазона дозировок для использования у людей. Дозировка таких соединений предпочтительно лежит в диапазоне концентраций в плазме, которые включают  $ED_{50}$  с небольшой токсичностью или без токсичности. Дозировка может варьировать в пределах этого диапазона в зависимости от используемой дозированной формы и используемого способа введения. см., например Fingl *et al.*, в: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ch,1, p.1, 1975. Точный состав, путь введения и дозировка могут быть выбраны индивидуальным лечащим врачом с учетом состояния пациента и конкретного способа, в котором используют соединение.

[0268] Когда необходимо или желательно парентеральное применение, в частности приемлемые смеси для соединений, включенных в фармацевтическую композицию, могут представлять собой инъекционные стерильные растворы, масляные или водные растворы, а также суспензии, эмульсии или имплантаты, включая суппозитории. В частности, носители для парентерального введения включают водные растворы декстрозы, чистую воду, этанол, глицерин, пропиленгликоль, арахисовое масло, кунжутное масло, полиоксиэтилен-блок-полимеры, и тому подобное. Ампулы являются общепринятыми единичными дозированиями. Фармацевтические смеси, приемлемые для использования в фармацевтических композициях, представленных в данном документе, могут включать те, которые описаны, например, в Pharmaceutical Sciences (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) и WO 96/05309, принципы обоих из которых являются включенными в данный документ в качестве ссылки.

### III. Способы ингибирования

[0269] Кроме того, представленными в данном документе являются способы ингибирования дезоксицитидинкиназы. В одном аспекте, способ включает контактирование дезоксицитидинкиназы с эффективным количеством соединения,

описанного в данном документе, тем самым, ингибируя дезоксицитидинкиназу. Контактное взаимодействие может осуществляться *in vitro*. Контактное взаимодействие может осуществляться *in vivo*.

#### **IV. Способы лечения**

[0270] Кроме того, представленными в данном документе являются способы лечения заболевания у субъекта, который в этом нуждается. В одном аспекте предусматривается способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, путем введения субъекту эффективного количества соединения, описанного в данном документе.

[0271] Рак может представлять собой лейкоз или лимфому. Рак может представлять собой лейкоз. Рак может представлять собой острый лимфобластный лейкоз (ALL). Рак может представлять собой лимфому. Рак может представлять собой солидный опухолевый рак. Солидный опухолевый рак может характеризоваться высоким уровнем репликационного стресса, как определено путем измерения экспрессии гамма H2A.X. Рак может представлять собой рак яичников, рак поджелудочной железы, рак легкого, глиобластому, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак предстательной железы или рак головы и шеи. Рак может представлять собой рак яичников. Рак может представлять собой рак поджелудочной железы. Рак может представлять собой рак легкого. Рак может представлять собой глиобластому. Рак может представлять собой гепатоцеллюлярную карциному. Рак может представлять собой рак молочной железы. Рак может представлять собой тройной негативный рак молочной железы. Рак может представлять собой рак предстательной железы. Рак может представлять собой рак головы и шеи.

#### **V. Другие аспекты**

[0272] Представленными в данном документе, в другом аспекте, являются композиции и способы лечения заболевания. Следующие определения и варианты реализации изобретения применяются только к соединениям формулы (pI), данному разделу (т.е. разделу V) и вариантам реализации изобретения P1 - P25, перечисленным ниже.

[0273] Для целей данного раздела, термин “алкил” касается и включает линейные или разветвленные одновалентные углеводородные структуры и их комбинацию, который может быть полностью насыщенным, моно- или полиненасыщенным, имеющий определенное количество атомов углерода (т.е., C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> означает от одного до десяти

углеродов). Конкретные алкильные группы являются такими, которые имеют от 1 до 20 атомов углерода (“C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкил”). Более конкретные алкильные группы являются такими, которые имеют от 1 до 8 атомов углерода (“C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил”), 3 - 8 атомов углерода (“C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> алкил”), от 1 до 6 атомов углерода (“C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил”), от 1 до 5 атомов углерода (“C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> алкил”), или от 1 до 4 атомов углерода (“C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил”). Примеры насыщенных углеводородных радикалов включают, но не ограничиваются этим, группы, такие как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, гомологи и изомеры, например, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил, и аналогичные. Ненасыщенная алкил группа представляет собой группу, которая имеет одну или больше двойных связей или тройных связей. Примеры ненасыщенных алкильных групп включают, но не ограничиваются этим, винил, 2-пропенил, кротоновую группу, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутини́л, и высшие гомологи и изомеры. Примеры насыщенного C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила включают метил (CH<sub>3</sub>), этил (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), пропил (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>) и бутил (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>). Примеры насыщенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила включают метил (CH<sub>3</sub>), этил (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), пропил (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>), бутил (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>), пентил (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>) и гексил (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>).

**[0274]** Алкильная группа может представлять собой замещенный (т.е., один или больше атомов водорода замещены на одновалентные или двухвалентный радикалы) одним или больше заместителями, такими как радикалы, описанные в данном документе, например, фтор, хлор, бром, йод, гидроксил, алкокси, тио, амино, ациламино, алкоксикарбониламино, карбоксил, ацил, алкоксикарбонил, сульфонил, циклоалкил, арил, гетероциклил и гетероарил, и другие функциональные группы, известные в данной области. “Перфторалкил” касается алкильной группы, где каждый атом водорода замещается на атом фтора. Примеры насыщенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> перфторалкила включают трифторметил (CF<sub>3</sub>), пентафторэтил (C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>), гептафторпропил (C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>), нонафторбутил (C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>), ундекафторпентил (C<sub>5</sub>F<sub>11</sub>) и тридекафторгексил (C<sub>6</sub>F<sub>13</sub>).

**[0275]** Для целей данного раздела, термин “циклоалкил” касается и включает циклические одновалентные углеводородные структуры, которые могут быть полностью насыщенными, моно- или полиненасыщенными, имеющими определенное количество атомов углерода (т.е., C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> означает от одного до десяти углеродов). Циклоалкил может состоять из одного кольца, такой как циклогексил, или нескольких колец, такой как алма́нт, но исключает арильные группы. Циклоалкил, содержащий больше, чем одно кольцо, может быть анелированным, спиро или мостиковым, или их комбинациями. Предпочтительный циклоалкил представляет собой циклический углеводород, имеющий

от 3 до 13 кольцевых атомов углерода. Более предпочтительный циклоалкил представляет собой циклический углеводород, имеющий от 3 до 8 кольцевых атомов углерода (“C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкил”). Примеры циклоалкила включают, но не ограничиваются этим, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил, норборнил, и аналогичные.

**[0276]** Для целей данного раздела, термин “гетероцикл” или “гетероциклил” касается насыщенной или ненасыщенной неароматической группы, имеющей от 1 до 10 кольцевых атомов углерода и от 1 до 4 кольцевых гетероатомов, таких как азот, сера или кислород, и аналогичные, где атомы азота и серы необязательно являются окисленными, и атом(ы) азота необязательно являются кватернизированным(ми). Гетероциклильная группа может иметь одно кольцо или несколько конденсированных колец, но исключает гетероарильные группы. Гетероцикл, содержащий больше, чем одно кольцо, может быть анелированным, спиро или мостиковым, или какой-либо их комбинацией. В анелированной кольцевой системе, одно или больше анелированных колец могут представлять собой арил или гетероарил. Примеры гетероциклических групп включают, но не ограничиваются этим, тетрагидропиранил, дигидропиранил, пиперидинил, пиперазинил, пирролидинил, тиазолинил, тиазолидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиофенил, 2,3-дигидробензо[b]тиофен-2-ил, 4-амино-2-оксопиримидин-1(2H)-ил, и тому подобные.

**[0277]** Для целей данного раздела, термин “арил” касается и включает полиненасыщенные ароматические углеводородные заместители. Арил может содержать дополнительные анелированные кольца (например, от 1 до 3 колец), включая, кроме того, анелированные арильные, гетероарильные, циклоалкильные и/или гетероциклические кольца. В одном варианте, арильная группа содержит от 6 до 14 кольцевых атомов углерода. Примеры арильных групп включают, но не ограничиваются этим, фенил, нафтил, бифенил, и аналогичные.

**[0278]** Для целей данного раздела, термин “гетероарил” касается и включает ненасыщенных ароматических циклических групп, имеющих от 1 до 10 кольцевых атомов углерода и, по меньшей мере, один кольцевой гетероатом, включая но не ограничиваясь этим, гетероатомы, такие как азот, кислород и сера, где атомы азота и серы необязательно являются окисленными, и атом(ы) азота необязательно являются кватернизированными. Гетероарильная группа может быть присоединенной к остатку молекулы кольцевым углеродом или кольцевым гетероатомом. Гетероарил может содержать дополнительные

анелированные кольца (например, от 1 до 3 колец), включая, кроме того, анелированные арильные, гетероарильные, циклоалкильные и/или гетероциклические кольца. Примеры гетероарильных групп включают, но не ограничиваются этим, пиридил, пиримидил, тиофенил, фуранил, тиазолил, и аналогичные.

**[0279]** Циклоалкильные, арильные, гетероциклические и гетероарильные группы как об этом говорится в данном разделе, также может быть замещенной одним или больше заместителями, такими как радикалы, подробно описанные в данном документе, например, фтор, хлор, бром, йод, гидроксил, алкокси, тио, amino, ациламино, алкоксикарбониламино, карбоксил, ацил, алкоксикарбонил, сульфонил, алкил, циклоалкил, арил, гетероциклил и гетероарил, и другие функциональные группы, известные в данной области.

**[0280]** Для целей данного раздела, термин “фармацевтически приемлемый носитель” касается ингредиента в фармацевтическом препарате, кроме активного ингредиента, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничивается этим, буфер, наполнитель, стабилизатор или консервант, такой как те, что известны в данной области, например, описанный в *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

**[0281]** Как используется в данном разделе, “лечение” или “способ лечения” представляет собой подход для получения полезных или желаемых результатов, включая и предпочтительно клинические результаты. Например, благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, один или больше из следующих: снижение симптомов, возникающий в результате заболевания, повышение качества жизни людей, страдающих от заболевания, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, замедление прогрессирования заболевания, и/или увеличение продолжительности жизни индивидуумов.

**[0282]** Как используется в данном разделе, фраза “замедление развития заболевания” означает отсрочку, препятствование, замедление, задержку, стабилизацию и/или откладывание развития заболевания (такого как рак). Данное замедление может быть различной продолжительности времени в зависимости от истории заболевания и/или индивидуального, подвергаемого лечению. Как очевидно для квалифицированного специалиста в данной области, достаточное или значительное замедление, в

действительности, может включать предупреждение, в том смысле, что у индивидуума не развивается заболевание. Например, рак поздней стадии, такой как развитие метастаз, может быть отсрочен.

**[0283]** Как используется в данном разделе, “эффективная дозировка” или “эффективное количество” лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции означает количество достаточное для реализации изобретения полезных или желаемых результатов. Для профилактического применения, благоприятные или желаемые результаты включают результаты, такие как устранение или снижение риска, уменьшение тяжести или отсрочка начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, присутствующие во время развития заболевания. Для терапевтического применения благотворные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как снижение одного или больше симптомов, возникающих в результате заболевания, повышение качества жизни людей, страдающих от заболевания, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, усиление эффекта другой лекарственного средства, например, путем направленного взаимодействия, замедление прогрессирования заболевания, и/или увеличение продолжительности жизни. В случае рака или опухоли, эффективное количество лекарственного средства может иметь эффект снижения количества раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирования (т.е., замедления до некоторой степени и предпочтительно остановки) проникновения раковых клеток в периферические органы; ингибирования (т.е., замедления до некоторой степени и предпочтительно остановки) метастазирования опухоли; ингибирования, до некоторой степени, роста опухоли; и/или облегчения до некоторой степени одного или более симптомов, связанных с расстройством. Эффективная дозировка может быть введена в один или несколько приемов. Для целей данного раздела, эффективная дозировка лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции означает количество достаточное для достижения профилактического или терапевтического лечения или непосредственно, или опосредовано. Как очевидно в клиническом контексте, эффективная дозировка лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может или не может достигаться в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, “эффективная дозировка” может рассматриваться в контексте введения одного или

нескольких терапевтических агентов, и один агент может рассматриваться как такой, который дается в эффективном количестве, если, в сочетании с одним или несколькими другими агентами, может быть или достигается желаемый результат.

**[0284]** Как используется в данном разделе, “в сочетании с” касается введения одного способа лечения в дополнение к другому способу лечения. Таким образом, “в сочетании с” касается введения одного способа лечения перед, во время или после введение другого способа лечения индивидууму.

**[0285]** Если явно не указано иное, для целей данного раздела, термин “индивидуум” как используется в данном документе касается млекопитающего, включая, но не ограничиваясь этим, крупный рогатый скот, лошадь, домашнюю кошку, кролика, собаку, грызунов или примата (например, человека). В некоторых вариантах реализации изобретения, индивидуум является человеком. В некоторых вариантах реализации изобретения, индивидуум не является человекообразным приматом, таким как шимпанзе и другие виды обезьян и мартышек. В некоторых вариантах реализации изобретения, индивидуум является сельскохозяйственным животным, таким как крупный рогатый скот, лошади, овцы, козы и свиньи; домашними животными, такими как кролики, собаки и кошки; лабораторными животными, включая грызунов, таких как крысы, мыши и морские свинки; и тому подобное. Аспекты, описанные в данном разделе, могут найти применение, как в медицине человека, так и в ветеринарии контексте.

**[0286]** Как используется в данном разделе и в прилагаемых вариантах реализации изобретения P1-P25, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указано иное.

**[0287]** Понятно, что аспект и вариации аспектов, описанных в данном разделе, включают “состоящий” и/или “состоящий в основном из” аспектов и вариаций.

**[0288]** *Способы лечения*

**[0289]** В другом аспекте данного раздела, соединения, представленные в данном документе, связываются с полипептидом дезоксицитидинкиназы и ингибируют ее активность. Таким образом, предусмотренными в данном разделе являются способы ингибирования активности dCK и лечения заболеваний и расстройств, где задействована активность dCK.

**[0290]** Эффективность dCK ингибиторных активностей соединений может быть исследована путем измерения поглощения клеточного субстрата и фосфорилирования, для примеров, поглощения [<sup>3</sup>H]-дезокситидина (dCyd или dC) в СЕМ (человека) или L1210 (мышь) клетках. Соединения могут быть дополнительно проверены на низкую побочную токсичность (например, ингибирование роста и пролиферации dCK отрицательных клеток) и селективность по отношению к другим нуклеозидкиназам (например, тимидинкиназе).

**[0291]** В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, предусмотренным является способ ингибирования активности дезоксицитидинкиназы (dCK), включающий контактирование соединения, детально описанного в разделе V, (например, соединение формулы (pI)) с дезоксицитидинкиназой, или *in vitro* (например, в параметрах ферментного анализа или анализа на основе клеток) или *in vivo* (например, в моделях на животных или у индивидуального субъекта, нуждающегося в лечении).

**[0292]** В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, предусмотренным является способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества соединения, детально описанного в разделе V (например, соединение формулы (pI)), или его фармацевтически приемлемой соли, и тимидина. Соединение вводят в сочетании с тимидином. В некоторых вариантах реализации изобретения, соединение вводят перед, во время или после введения тимидина. Примеры рака, который подвергают лечению, включают, но не ограничиваются этим, лейкоз, лимфому, рак молочной железы, рак яичников, рак легкого, рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, саркому, рак головы и шеи, глиому, глиобластому, и рак, независимо от ткани происхождения, который характеризуется геномной нестабильностью и/или активацией ответа повреждения ДНК. Ингибирование dCK соединением, подробно описано в данном документе (например, соединение формулы (pI)), или его фармацевтически приемлемой солью, дает синергетический эффект с тимидином, чтобы вызвать остановку клеточного цикла в опухолях.

**[0293]** Не желая быть связанными теорией, в вариантах реализации изобретения данного раздела, фармакологические подходы вызывают нуклеотидную недостаточность в высоко пролиферирующих опухолях для того, чтобы блокировать их пролиферацию путем их остановки в S-фазе клеточного цикла. Например, пулы дезоксицитидинтрифосфата

(дЦТФ) истощаются тимидином в сочетании с ингибиторами дезоксицитидинкиназы (dCK). Функция тимидина заключается в блокировании способности рибонуклеотидредуктазы (RR), ограничении скорости фермента в синтезе дезоксирибонуклеотида, продуцировании дезоксицитидинтрифосфата (дЦТФ), одного из 4 структурных элементов ДНК. Единственный способ генерирования дЦТФ в раковых клетках заключается в рециклинге предварительно образованного дезоксицитидина из внеклеточной среды; дезоксицитидинкиназа является важной для процесса рециклинга; низкомолекулярные ингибиторы, которые блокируют активность dCK и, в комбинации с тимидином, страдают от голода раковые клетки дЦТФ, таким образом, предотвращая их пролиферацию.

**[0294]** В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, предусмотренным является способ лечение иммунного нарушения у индивидуума, который в этом нуждается, включающий введение индивидууму эффективного количества соединения, подробно описанного в данном документе (например, соединения формулы (pI)), или его фармацевтически приемлемой соли. Иммунное расстройство может представлять собой аутоиммунное расстройство или отторжение трансплантата. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, аутоиммунное расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство опосредованное Т клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, аутоиммунное расстройство выбирают из группы, состоящей из рассеянного склероза, волчанки (включая системную красную волчанку), воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит и диабет типа 1.

**[0295]** Кроме того, предусмотренными являются композиции, такие как фармацевтические композиции, содержащие соединение, описанное в данном разделе (например, формулы (pI)), или его соль, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции в соответствии с данным разделом могут принимать форму, приемлемую для перорального, буккального, парентерального, назального, местного или ректального введения, или форму, приемлемую для введения путем инъекции, в.в., инфузии или ингаляции.

**[0296]** Соединения, описанные в данном разделе (например, соединение формулы (I)), а также способы использования таких же, если не указано иное, включают все солевые формы соединений. Также включены все несолевая формы какой-либо соли соединения,

описанного в данном разделе, а также другие соли какой-либо соли соединения, описанного в данном разделе. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, соли соединений представляют собой фармацевтически приемлемые соли. Желаемая соль основной функциональной группы соединения могут быть получена по способам, известным специалистам в данной области путем обработки соединения кислотой. Желаемая соль кислотной функциональной группы соединения могут быть получены по способам, известным специалистам в данной области путем обработки соединения основанием. Примерами неорганических солей кислотных соединений включают, но не ограничиваются этим, соли щелочных и щелочно-земельных металлов, такие как соли натрия, соли калия, соли магния, соли висмута и соли кальция; соли аммония; и соли алюминия. Примеры органических солей кислотных соединений включают, но не ограничиваются этим, соли прокаина, дибензиламина, *N*-этилпиперидина, *N,N'*-дибензилэтилендиамина, триметиламина и триэтиламина. Примеры неорганических солей основных соединений включают, но не ограничиваются этим, гидрофторидные, гидрохлоридные, гидробромидные, гидроиодидные, сульфатные, гидросульфатные, фосфатные, гидрофосфатные, дигидрофосфатные, карбонатные, бикарбонатные и нитратные соли. Примеры органических солей основных соединений включают, но не ограничиваются этим, тартрат, цитрат, малеат, фумарат и сукцинат.

**[0297] *PET зонд и визуализация***

**[0298]** Кроме того, предусмотренным в данном разделе является способ визуализации, включающий: контактирование *PET* зонда, описанного в данном документе, с биологическим материалом; использование *PET* визуализации для определения локальной концентрации соединения в биологическом материале; и соотнесение локальной концентрации соединения с локальным иммунным ответом или присутствием опухолевой ткани. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном разделе, контактирование соединения с биологическим материалом включает введение количества соединения животному или человеку; и соотнесение локальной концентрации соединения в организме животного или человека с локальным иммунным ответом или опухолевой тканью у животного или человека. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, способ дополнительно включает использование локальной концентрации соединения для диагностики рака и/или мониторинга лечения рака. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, животное или человек имеет состояние, выбранное из группы, состоящей из рака, аутоиммунного расстройства,

расстройства развития, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, паразитарной инфекции, инфекции, заболевания обмена веществ и воспаления. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, животное или человек имеет состояние, выбранное из группы, состоящей из лимфаденопатии, меланомы, лейкоза и глиомы. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, животное или человек имеет состояние, выбранное из группы, состоящей из ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ), рассеянного склероза, сахарного диабета 1 типа и атеросклероза. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, животное или человек проходит терапию, выбранную из группы, состоящей из иммунотерапии рака, иммунотерапии, терапии интерфероном, вакцинации, лучевой терапии, химиотерапии и терапии антибиотиками. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, контактирование соединения с биологическим материалом включает введение количества соединения животному или человеку; и соотнесение локальной концентрации соединения в организме животного или человека с аномальной активностью в органе или части лимфатической системы, например, лимфатическом узле или селезенке. В одном варианте способов данного раздела, способ дополнительно включает соотнесение локальной концентрации соединения с поражением лимфомы или злокачественным лимфоидным заболеванием. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, локальный иммунный ответ представляет собой накопление активированных Т лимфоцитов. В одном варианте способов данного раздела, активированные Т лимфоциты поглощают больше соединения на клетку, чем не активированные Т лимфоциты.

**[0299]** Кроме того, предусмотренным в данном разделе является способ прогнозирования резистентности к онколитическому агенту, включающий: контактирование РЕТ зонда, подробно описанного в данном документе, с новообразованием; использование РЕТ визуализации для определения локальной концентрации соединения в новообразовании; сравнение локальной концентрации соединения с базовым уровнем; соотнесение локальной концентрации соединения значительно более низкой, чем базовый уровень с низкой экспрессией dCK новообразования; соотнесение низкой экспрессии dCK новообразования с резистентностью к онколитическому нуклеозидному аналогу, где базовый уровень соответствует измеренной концентрации соединения в типичных неопластических клетках, которые экспрессируют dCK, концентрации соединения в типичных

неопластических клетках, которые не экспрессируют dСК, или средневзвешенное состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном разделе, новообразование является Т лимфоцитной линией. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном разделе, новообразование выбирают из группы, состоящей из лейкоза, острого нелимфоцитарного лейкоза, фазы бластных клеток хронического миелоцитарного лейкоза, менингеального лейкоза, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, рецидивирующего острого лимфобластного лейкоза и резистентного острого лимфобластного лейкоза клетки.

**[0300]** Кроме того, предусмотренным в данном разделе является способ изучения применения соединения в PET процессе, где способ включает стадии:

- a) включение “холодного” атома фтора 19 в определенное положение в соединении PET зонда, подробно описанное в данном документе;
- b) замещение “холодного” атома фтора 19 на “горячий” атом фтора 18;
- c) введение соединения со стадии (b) млекопитающему; и
- d) обнаружение и/или количественное определение соединения со стадии (b) в организме млекопитающего с помощью PET визуализации.

**[0301]** В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, способ дополнительно включает стадии:

- e) построения кинетической модели биораспределения лекарственного средства *in vivo* по данным PET; и
- f) повторение стадий (a) - (e) для дальнейшей модификации и улучшения РК соединений, определенных с помощью PET визуализации, чтобы иметь неблагоприятное биораспределение у мышей и/или людей.

**[0302]** Кроме того, предусмотренным в данном разделе способ оценки эффективности соединения ингибитора dСК, включающий: введение соединения ингибитора dСК индивидууму; обеспечение  $^{18}\text{F}$ - PET зонда индивидууму; визуализацию для определения локальной концентрации  $^{18}\text{F}$ - PET зонда; и соотнесение локальной концентрации  $^{18}\text{F}$ - PET зонда с эффективностью соединения ингибитора dСК. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, индивидуумом является млекопитающее, такое как экспериментальная мышь, используемая в модели на животных для исследования

ингибирования dСК. Способ обеспечивает эффективный путь скрининга *in vivo* на предмет эффективности соединений в моделях на животных. Способ может быть применен к каким-либо ингибиторам dСК, таким как соединения ингибитора dСК, подробно описанные в данном документе, или их фармацевтически приемлемой соли.

**[0303]** Некоторые варианты реализации изобретения аспектов данного раздела дополнительно описаны ниже. При описании вариантов реализации изобретения, специальная терминология используется для ясности. Тем не менее, аспекты в данном разделе не предназначены для ограничения специальной терминологии, выбранной таким образом. Специалисту в соответствующей области будет понятно, что могут быть использованы другие эквивалентные части, и другие способы, разработанные без отхода от сущности и объема изобретения. Все ссылки, приведенные в данном документе, включены в качестве ссылки, так, как если бы каждый из них была индивидуально включена.

**[0304]** Как было отмечено выше, dСК является клинически важной полипептидной мишенью из-за, например, своей роли в клеточном делении (например, в качестве скорость-лимитирующего фермента в метаболизме дезоксирибонуклеозидной реутилизации), а также своей ассоциации с резистентностью к лекарственному средству и/или чувствительностью к лекарственному средству. Исследования с использованием модели dСК нокаут мыши, разработанной нашей группой, показывают, что активность dСК требуется для формирования дезоксицитидинтрифосфата (дЦТФ), необходимым нуклеотидом, используемым для восстановления ДНК в лимфоцитах и в некоторых видах рака. Исследования также показывают, что dСК может функционировать как резервный механизм для продуцирования дезоксирибонуклеотидов (dNTP) для репликации ДНК, когда клетками используется выходной сигнал основного метаболического пути, чтобы сделать так, что dNTP становится недостаточным для поддержки быстрого роста раковых клеток. Настоящее изобретение иллюстрирует разработку соединений, которые связывают этот полипептид (включая низкомолекулярные ингибиторы).

**[0305]** Соединения, которые связывают dСК, включая низкомолекулярные ингибиторы, которые описаны в данном разделе, являются полезными в различных контекстах, например, как зонды в способах позитронно-эмиссионной томографии. Кроме того, данные соединения являются полезными в разработке новых терапевтических агентов для определенных патологических состояний, таких как рак и клеточно-опосредованные

аутоиммунные заболевания. Низкомолекулярные ингибиторы dСК, раскрытые в данном документе также являются полезными в процессах, предназначенных для изучения метаболизма нуклеиновой кислоты в нормальных и злокачественных тканях. Такие процессы могут быть использованы, например, для содействия в разработке новых терапий рака и аутоиммунных заболеваний, которые работают за счет селективного вмешательства в способность быстрого пролиферирования патогенных клеток для восстановления и репликации их ДНК.

**[0306]** Одна наглядная стратегия, используемая для разработки ингибиторов dСК, описанных в данном разделе, пользуется преимуществом способов позитронно-эмиссионной томографии (PET). В данном контексте, иллюстративные терапевтические кандидатные соединения были разработаны, чтобы легко включать атом фтора 19. Атом фтора 19, включенный в остов соединений, раскрытых в данном документе, потом могут быть легко заменены радиоактивным изотопом фтора 18 для того, чтобы генерировать радиоактивно меченый вариант соединения, тот, который может быть обнаружен и количественно определен неинвазивно по всему телу живых организмов, используя способы визуализации PET. При использовании соединений, созданных таким образом (например, чтобы воспользоваться преимуществом способов визуализации PET), специалисты в данной области затем могут использовать разнообразность неинвазивных фармакокинетических (PK) способов, чтобы изучить терапевтический потенциал данных соединений (например, в моделях на животных). Эта стратегия, как правило, применяется в исследовании и разработке лекарственного средства и может ускорить данный процесс, в то же время, снижая свои затраты (например, позволяя быстро идентифицировать терапевтические кандидаты с оптимальными PK свойствами).

**[0307]** Как было отмечено выше, низкомолекулярные ингибиторы dСК, раскрытые в данном разделе, были разработаны, чтобы быть легко доступными для одностадийного введения радиоактивной метки фтора 18 для исследования визуализации PET PK лекарственного средства в моделях на животных и у людей. Данный дизайн обеспечивает данные соединения со значительным преимуществом над химически различными низкомолекулярными ингибиторами dСК, которые требуют несколько стадий введения радиоактивной метки. Важный дополнительный элемент обеспечивается сериями FAS зондов визуализации PET, которые описаны в заявке на патент США серийный № 12/234478, содержание которого включено в качестве ссылки. Данные FAS зонды позволяют специалистам в данной области неинвазивно характеризовать

фармакодинамические (PD) свойства кандидатных терапевтических соединений в различных видах животных (например, мышах и людях).

**[0308]** Как было отмечено выше, соединения, описанные в данном разделе, обеспечивают низкомолекулярные ингибиторы дезоксицитидинкиназы (dCK), скорость-лимитирующего фермента в метаболизме реутилизации дезоксирибонуклеозида. Мы разработали и проверяли PET зонды для измерения активности dCK *in vivo* (см., например Nat. Med. 2008 Jul; 14(7):783-8; JNM. 2010 Jul; 51(7):1092-8). Следовательно, данные проверенные PET зонды могут быть использованы в качестве фармакодинамических биомаркеров для проверки эффективности новых связывающих dCK соединений, раскрытых в данном документе.

**[0309]** Как уже отмечалось, в некоторых вариантах реализации изобретения соединений данного раздела используются в качестве зондов в способах визуализации, созданных для мониторинга одного или больше аспектов клеточной физиологии. В этом контексте, варианты реализации изобретения данного раздела могут быть использованы, например, для мониторинга иммунной функции по всему телу, способ мониторинга, который может существенно повлиять на оценку диагностики и лечения иммунологических нарушений. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, соединение используют как PET зонд в процессе визуализации одного или нескольких признаков биологического материала как часть диагностического или терапевтического способа. Например, PET зонд может быть использован для диагностики и лечения состояния, выбранного из группы, состоящей из ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, сахарного диабета типа 1, EAE (экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита), рассеянного склероза, атеросклероза, аутоиммунного расстройства и рака. Кроме того, PET зонд может быть использован для оценки эффективности противораковых агентов в лечении рака, которые захватываются в клетки с помощью нуклеозид-транспортеров и фосфорилирования, опосредованного дезоксицитидинкиназой (dCK). Как очевидно квалифицированному специалисту в данной области, в дополнение к соединению, композиции данного раздела могут включать один или больше фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов. Квалифицированный специалист в данной области будет иметь возможность выбора подходящих фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов, основанных на предусматриваемом применении.

**[0310]** Иллюстративные способы визуализации в соответствии с аспектами, описанными в данном разделе, как правило, включают одну или больше следующих стадий. PET зонд может контактировать с биологическим материалом. PET визуализацию потом могут использовать для определения локальной концентрации PET зонда в биологическом материале. И локальная концентрация зонда PET затем может быть соотнесена с локализованным метаболизмом нуклеотида, например, накоплением активированных Т лимфоцитов (например, как активированные Т лимфоциты захватывают больше PET зонда на клетку, чем неактивированные Т лимфоциты). Таким образом, PET визуализация может быть использована для определения локальной концентрации PET зонда, введенного животному или человеку, и локальная концентрация PET зонда затем может быть соотнесена с аспектами метаболизма нуклеотида, например, с локальным иммунным ответом или аномальным ростом клеток. Например, локальная концентрация PET зонда может быть соотнесена с аномальной клеточной активностью в органе или части лимфатической системы, например, в лимфатических узлах или в селезенке. Аналогичным образом, локальная концентрация PET зонда может быть соотнесена с лимфомным очагом или с злокачественным лимфоидным заболеванием.

**[0311]** Животное или человек, для которого используют соединение, раскрытое в данном документе, могут, например, иметь состояние, такое как рак, лимфаденопатия, меланома, лейкоз, глиома, аутоиммунное расстройство, расстройство развития, вирусная инфекция, бактериальная инфекция, паразитарная инфекция, инфекция, метаболическое заболевание, воспаление, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, диабет типа 1, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ), рассеянный склероз и/или атеросклероз. В таком контексте, PET зонд может быть использован в процедуре для диагностики и/или лечения такого состояния. Например, животное или человек может подвергаться терапии, такой как иммунотерапия рака, иммунотерапия, терапия интерфероном, вакцинация, лучевая терапия, химиотерапия и/или терапия антибиотиками. В иллюстративном варианте реализации изобретения данного раздела, локальная концентрация PET зонда может быть использована для диагностики рака и/или мониторинга лечения рака.

**[0312]** В конкретном иллюстративном варианте реализации изобретения данного раздела, активация лимфоцитов может неинвазивно контролироваться путем инъекционного введения субъекту животному или человеку следовых количеств PET зонда, раскрытого в данном документе, что позволяет зонду аккумулироваться в местах

локальной иммунной активации и затем контролировать субъект на уровне всего тела, используя PET сканер. Такой PET зонд могут вводить животному или человеку с целью диагностики, например, чтобы определить наличие или степень заболевания или расстройства (такого как, рак, аутоиммунное заболевание, расстройство развития, вирусная инфекция, бактериальная инфекция, паразитарная инфекция, другие инфекции, метаболическое заболевание или воспаление). В вариантах реализации изобретения данного раздела, PET зонд могут вводить для мониторинга прогрессирования рака или других типов заболевания, основанных на иммунотерапии, терапии интерфероном, вакцинации, лучевой терапии и терапии антибиотиками.

**[0313]** Варианты реализации изобретения данного раздела, кроме того, предусматривают способы оценки эффективности использования конкретных классов противораковых агентов в лечении рака, такого как те, которые поглощают в клетки с помощью нуклеозид-транспортеров и фосфорилирования, опосредованного дезоксицитидинкиназой (dCK). Например, PET зонд может быть использован для оценки эффективности противоракового агента в лечении рака, например, цитарабина или 2'-дифтордезоксцитидина, который захватывается в клетках с помощью нуклеозид-транспортеров и фосфорилирования, опосредованного дезоксицитидинкиназой (dCK). Дополнительный аспект данного раздела относится к способам диагностики и лечения состояний, которые вовлекают клетки с высокой активностью пути реутилизации дезоксирибонуклеозида, например, лимфоциты, клетки костного мозга и кишечные энтероциты. В другом аспекте данного раздела предусматриваются композиции, содержащие соединения, раскрытые в данном документе. В еще другом аспекте данного раздела предусматриваются наборы, включающий какой-либо вариант реализации изобретения данного раздела.

**[0314]** Другие варианты реализации изобретения данного раздела включают продукты производства и/или наборы, например, те, которые содержат материалы, полезные в диагностических способах визуализации. Альтернативно, продукты производства и/или наборы данного раздела могут содержать материалы полезные в лечении патологического состояния, такого как иммунного нарушения или рак. В типичных вариантах реализации изобретения данного раздела, набор содержит, по меньшей мере, один контейнер, как правило, с этикеткой. Приемлемые контейнеры включают, например, блистерные упаковки, бутылки, флаконы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как металл (например, металлическая фольга), стекло или

пластик. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, один или больше контейнеров содержит одну или больше композиций, имеющих активный агент, который является эффективным в диагностических способах визуализации. В других вариантах реализации изобретения данного раздела, один или больше контейнеров содержит одну или больше композиций, имеющих активный агент, который является эффективным в лечении патологического состояния, такого как иммунное нарушение или рак. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, активные агент в композиции представляет собой соединение, связывающее dСК, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, набор включает композицию, содержащую соединение, связывающее dСК, как описано в данном разделе, и тимидин (например, в комбинированном препарате или “коктейле”). В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, набор включает первую композицию, содержащую соединение, связывающее dСК, в первом контейнере, и вторую композицию, содержащую тимидин во втором контейнере. Как правило, этикетка на одном или больше контейнерах указывает на то, что одна или больше композиций используют для диагностических способов визуализации или в лечении патологического состояния, такого как иммунное расстройство и/или рак. Такие этикетки могут также указывать направления использования или *in vivo* или *in vitro*, такие как те, что описаны в данном документе. Наборы данного раздела могут также включать один или больше контейнеров, описанных выше, и дополнительный контейнер, включающий буфер. Наборы данного раздела могут дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы, и вкладыши в упаковки с инструкциями по применению.

**[0315]** Представленный раздел также предусматривает инструмент исследования, включающий соединение данного раздела для изучения метаболизма нуклеиновой кислоты в нормальных и злокачественных тканях. В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, серии FAS зондов PET визуализации, как описано в заявке на патент США с серийным № 12/234478, которая включена в данный документ в виде ссылки, используются для неинвазивного определения фармакодинамических (PD) свойств терапевтических кандидатов у мышей, других видов животных и у людей.

**[0316]** В некоторых вариантах реализации изобретения данного раздела, композиция вещества, включающая соединение, раскрытое в данном документе, может быть использован как терапевтический агент для лечения рака. В других вариантах реализации

изобретения данного раздела, композицию вещества используют как терапевтический агент для лечения аутоиммунных заболеваний. В некоторых случаях, композицию вещества могут использовать как терапевтический агент для лечения рака и/или аутоиммунных заболеваний путем связывания dСК по способу, который селективно препятствует способности быстрой пролиферации патогенных клеток для восстановления и репликации их ДНК. Как правило, терапевтические агенты, используемые в способах данного раздела, объединяются с фармацевтически приемлемым носителем. Термин “фармацевтически приемлемый носитель”, использованный в данном разделе, используют в соответствии с его общепринятым значением в данной области и предназначен, чтобы включать какой-либо и все растворители, дисперсионные среды, покрывающие вещества, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением тех случаев, когда какие-либо общепринятые среды или агент несовместимы с активным соединением, такие среды могут быть использованы в композициях данного раздела. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции. Фармацевтическая композиция данного раздела формулируется так, чтобы быть совместимым с предполагаемым способом введения.

**[0317]** Примеры в данном документе предусматривают дальнейшее раскрытие аспектов и вариантов реализации изобретения данного раздела.

**[0318]** Хотя приведенный выше раздел описан в некоторых деталях посредством иллюстрации и примера в целях ясности понимания, квалифицированному специалисту в данной области будет очевидно, что некоторые незначительные изменения и модификации будут применяться на практике в свете приведенного выше принципа. Таким образом, описание и примеры не должны быть истолкованы как ограничивающие объем какого-либо изобретения, описанного в данном документе.

**[0319]** Все ссылки, приведенные в данном документе, включая заявки на патенты и публикации, включены в данное описание в виде ссылки во всей их полноте.

## VI. Примеры

### 1. Пример 1

[0320] Дезоксицитидинкиназа (dCK) представляет собой дезоксирибонуклеозидкиназу, способную фосфорилировать дезоксицитидин, дезоксиаденозин и дезоксигуанозин до их монофосфатных форм с использованием или АТФ, или УТФ как доноров фосфорила.<sup>1</sup> Фосфорилирование dCK является скоростью-лимитирующей стадией в биохимическом пути, ответственном за превращение реутилизационного дезоксицитидина в дЦТФ и, в определенных типах клеток в dTTP, что делает их субстратами для ДНК полимераз. Помимо физиологической роли генерирования dNTP, dCK играет ключевую роль в активации нескольких нуклеозидных аналогов пролекарств ('nucs'), которые широко используются как противораковые.<sup>2</sup> Недавно, dCK идентифицировали в кроветворении в лимфоидных и эритроидных клетках-предшественниках. Киназа также участвует в регулировании G2/M транзиции в ответ на повреждение ДНК в раковых клетках.<sup>6</sup> Совсем недавно мы показали, что частичное ингибирование dCK активности, комбинированное с пертурбациями нуклеотида *de novo* путей синтеза был синтетически летальным для острых лимфобластных лейкозных клеток, но не для нормальных гематопозитических клеток.<sup>7</sup> Данные аспекты биологии dCK и ее потенциальная роль как новой терапевтической мишени при раке побудило нас разработать низкомолекулярные ингибиторы с их ферментной активностью.

[0321] Удачные соединения после скрининга с высокой пропускной способностью были разработаны, и последующая оптимизация молекул приводят к соединениям **Ia** и **Ib**,<sup>8</sup> Эта работа подробно описала взаимосвязь структура-активность (SAR) соединений, т.е., взаимосвязь между структурой малых молекул и их эффективности ингибирования. Недостаток кристаллической структуры комплекса между мишенью-ферментом и малой молекулой, традиционные исследования SAR противостоят неполному пониманию как наблюдаемым различиям в эффективности ингибирования между родственными молекулами. Это делает его трудным, чтобы уверенно идентифицировать сайты на ранее идентифицированных хитах, которые могут быть модифицированы для того, чтобы достичь аффинность связывания и/или увеличение метаболической стабильности. Соединения-прототипы **Ia** и **Ib** могут быть разделены на 4 различных структурных части (**Фигура 1A**). Часть А представляет собой пиримидиновое кольцо, которое связано через линкер (часть В) с 5-замещенным тиазольным кольцом (часть С), которое, в свою очередь,

связано с фенильным кольцом (часть D). Концептуально, каждая из этих частей может быть модифицирована, чтобы достичь желаемых свойств ‘лекарственное средство-аналог’. В предыдущей работе мы сфокусировались на тиазольном кольце, и кристаллическая структура dСК с одним из более ранних соединений дает основание предполагать, что 5-положение кольца может вмещать гидрофобные заместители, которые приводят к открытию того, что пропильная группа в 5-положение является выражено предпочтительной над метильной группой.<sup>8,9</sup>

[0322] Для руководства и рационализации усилий медицинской химии в других частях молекулы, мы определили кристаллические структуры человеческого dСК с несколькими из ингибиторов, которые мы разработали. Кристаллические структуры освещают взаимосвязь между структурой фермента, тонкая структура молекулы, и его ингибирование эффективности. Данное усилие, в конечном счете, в результате привело к соединениям-прототипам **Ia** и **Ib**. К сожалению, несмотря на наномолярное сродство dСК к нашим соединениям-прототипам, при исследовании в анализе микросом печени данные соединения продемонстрировали низкую метаболическую стабильность. Данный недостаток был резюмирован с помощью фармакокинетических исследований у мышей.<sup>8,7</sup>

[0323] Для идентификации ингибиторов с улучшенными свойствами *in vivo*, мы намереваемся исследовать дополнительные химические модификации, в частности те, которые поддерживают низкую наномолярную аффинность связывания соединений-прототипов. Кристаллические структуры хиральных соединений, описанных в данном документе, связанных с dСК, играли ключевую роль в установлении хиральности активной формы ингибитора. Путем комбинирования знаний органической химии с подробно описанной структурной информацией комплекс мишень-ингибитор мы идентифицировали соединение-прототип, которое сохраняет наномолярную аффинность для dСК, но получили значительную *in vivo* метаболическую стабильность. Данное соединение могло играть жизненно важную роль в какой-либо терапевтической стратегии, основанной на индукции чрезмерной стресс репликации ДНК путем пертурбации раковых dNTP пулов клетки.

[0324] Пиримидиновое кольцо (часть A молекул, **Фигура 1A**), как предсказывалось, было трудной частью молекулы для улучшения. Это происходит, потому что, как наблюдается в кристаллических структурах dСК в комплексе с соединениями-прототипами **Ia** и **Ib** (PDB коды 4L5B и 4KCG, соответственно) пиримидиновое кольцо

ингибитора связывается с dCK в положении, почти идентичному тому, которое свойственно пиримидиновому кольцу физиологического субстрата dC, образуя несколько водородных связей, гидрофобных и  $\pi$ - $\pi$  стекинг взаимодействий (**Фигура 9**). Этот режим связывания предполагал уже оптимизированное взаимодействие фермент-пиримидиновое кольцо. Для соединений **Ia** и **Ib**, обе экзоциклические аминогруппы пиримидинового кольца формировали водород-связывающие взаимодействия с боковыми цепями Glu53, Gln97 и Asp133. Следовательно, не удивительно, что одновременное удаление обеих аминогрупп в результате приводит к полной потере ингибирования dCK.<sup>8</sup> В отличие от этого, удаление одной аминогруппы для формирования соединения **1** (**Фигура 2A**), которое является идентичным к **Ia** за исключением того, что имеет одну экзоциклическую аминогруппу в пиримидиновом кольце (**Фигура 1A**), в результате приводит, аналогичным образом, к сильной аффинности связывания, как измерено для **Ib** (**Фигуры 1B и 2B**). Для того, чтобы объяснить, как аффинность **1** для dCK поддерживается только одной экзоциклической аминогруппой, мы искали кристаллическую структуру комплекса, но, к сожалению, нам не удалось получить кристаллы качества для дифракции. Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, мы полагаем, что единственная экзоциклическая аминогруппа, присутствующая в соединении **1** ориентируется в активном сайте dCK, таким образом, что она поддерживает его взаимодействие с Asp133, так как только в такой ориентации N-атом соседнего пиримидинового кольца может поддерживать свое взаимодействие с боковой цепью Gln97 (**Фигура 9**). Взаимодействие с Glu53, осуществляемое экзоциклической аминогруппой, когда она присутствует, вероятно, обеспечивает только умеренную дополнительную энергию связывания. В то время как одна экзоциклическая аминогруппа пиримидинового кольца является достаточной для сильного взаимодействия с dCK, в нашем анализе на основе СЕМ клеток соединение **1** демонстрировало намного более повышенное значение  $IC_{50}$  (21,8 нМ, **Фигура 2B**) по отношению к соединению **Ib** (4,9 нМ, **Фигура 1B**). Этот результат демонстрирует важность оценки взаимодействия между ингибитором и его мишенью, как в использовании ферментного анализа *in vitro*, так и в анализе на основе клеток. Из-за пониженного ингибирования активности dCK **1** в анализе на основе клеток, все будущие соединения содержали две экзоциклические аминогруппы.

[0325] Мы исследовали, если положение N-атомов пиримидинового кольца является важным за счет синтеза соединения **2** (**Фигура 2A**). Данное соединение, как измерено, связывается ~50-раз более высоким  $IC_{50}^{app}$  по сравнению с очень похожим соединением-

прототипом **Ia** (**Фигура 1A**), которое отличается только положением одного атома азота пиримидинового кольца. Мы определили с 2,0 Å разрешающей способностью кристаллическую структуру комплекса dCK-соединение **2**, чтобы понять, как данное едва различимое изменение так сильно повлияло на взаимодействие с ферментом (см. **Таблицу 1** по сбору данных и статистических уточнений).

**[0326]** Все исследованные соединения связываются с открытым состоянием фермента, который также является каталитически некомпетентным состоянием (для обсуждения об открытых и закрытых состояниях dCK см.<sup>10, 11</sup>). Ингибиторы связываются в пределах глубокой полости, с пиримидиновым кольцом ингибиторов, расположенных наиболее глубоко, и занимающих такое же положение, занятое пиримидиновым кольцом нуклеозидного субстрата.<sup>8, 9</sup> Тогда как, предотвращая связывание нуклеозидного субстрата, наши ингибиторы не препятствуют связыванию нуклеотида с донорным фосфорил-сайтом связывания. На самом деле, все кристаллические структуры dCK в комплексе с ингибиторами также содержали UDP в донорном сайте.

**[0327]** Несмотря на существенно различные значения  $IC_{50}^{app}$  между соединением **Ia** (14,5 нМ) и соединением **2** (754 нМ), пиримидиновое кольцо данных родственных молекул взаимодействует с ферментом через аналогичные гидрофобные и полярные взаимодействия. Последние включают Glu53, Gln97 и Asp133. Тем не менее, вся молекула **2** смещается приблизительно на 0,4 Å от дна полости связывания по отношению к соединению **Ia**. (**Фигура 2C** и **Фигура 10**). Кристаллическая структура предполагает, что фактор, ответственный за данный сдвиг, является привлечение молекулы воды (оранжевый кружочек, **Фигура 2C**) N, присутствующим в пиримидиновом кольце в соединении **2**. В отличие от этого, для соединения **Ia** СН-группа в данном положении устраняет потенциал для водородной связи. Эта молекула воды также удерживается на месте за счет взаимодействий с Arg104 и Asp133. Следовательно, несмотря на образование этого дополнительного опосредованного водой взаимодействия с ферментом, смещение от фермента, вызванное позволением молекуле воды связаться в этом положении, в конечном счете, снижает аффинность связывания **2**.

**[0328]** Основываясь на данных результатах, мы решили сохранить первоначальную структуру пиримидинового кольца и сосредоточиться на других частях молекулы как потенциальных местах модификации. Мы исследовали влияние различных заместителей в различных положениях фенильной группы (часть D молекулы, **Фигура 1A**).

**Таблица 1. Сбор данных и статистических уточнений**

Комплекс	2	3	4	5
PDB коды	4Q18	4Q19	4Q1A	4Q1B
<b>Статистика сбора данных</b>				
Источник рентгеновского излучения и детектор	LS-CAT ID-G MARCCD 300	LS-CAT ID-G MARCCD 300	LS-CAT ID-G MARCCD 300	LS-CAT ID-G MARCCD 300
Длина волны (Å)	0,9785	0,9785	0,9785	0,9785
Температура (К)	100	100	100	100
Разрешающая способность <sup>a</sup> (Å)	2,0 (2,1-2,0)	2,09 (2,21-2,09)	1,90 (2,01-1,90)	2,15 (2,28-2,15)
Количество рефлексов				
Наблюдаемое	194185	201554	273877	191219
Уникальное	38119	32496	43643	30472
Полнота ( %)	99,4 (99,9)	98,8 (93,9)	99,3 (98,4)	98,3 (97,4)
R <sub>sym</sub> ( %)	5,9 (54,7)	7,3 (67,9)	4,4 (62,9)	5,2 (55,2)
Среднее I/σ(I)	13,6 (2,7)	14,2 (2,5)	20,64 (2,54)	17,42 (2,87)
Пространственная группа	P4 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub>
Элементарная ячейка (Å): a=b, c	68,75, 122,45	68,53, 119,79	68,66, 120,36	68,97, 121,94
<b>Статистика уточнений</b>				
Уточняющая программа	Refmac5	Refmac5	Refmac5	Refmac5
Доля удвоений	0,5	0,5	0,5	0,5
R <sub>крис</sub> . ( %)	18,3	22,9	20,2	17,3
R <sub>св</sub> . ( %)	21,6	26,1	25,0	25,3
Диапазон разрешающей способности (Å)	30,0-2,0	30-2,09	30-1,9	30-2,15
Молекулы белка на ат.ед.	2	2	2	2
Число атомов:				

Белок (белА, белВ)	1921, 1902	1877, 1889	1890, 1904	1877, 1873
Молекулы воды	88	103	105	92
Ингибитор	32 x 4	27 x 2	30 x 2	32 x 2
UDP	25 x 2	25 x 2	25 x 2	25 x 2
R.m.s. отклонение от идеального:				
Длина связи (Å)	0,012	0,013	0,011	0,012
Углы связи (°)	1,66	1,84	1,65	1,70
Средние В-факторы (Å <sup>2</sup> )				
Белок (белА, белВ)	47,0, 46,9	30,1, 30,1	40,6, 40,7	53,8, 54,6
Молекулы воды	39,8	29,8	39,3	45,4
Ингибитор				
белА (301, 302)	46,6, 45,8	29,9, -	39,7, -	58,7, -
белВ (301, 302)	53,4, 41,2	30,0, -	40,1, -	58,3, -
UDP (белА, белВ)	51,6, 49,0	30,1, 30,3	41,4, 39,9	58,4, 58,5
Карта Рамачандрана (%)				
наиболее предпочтительные области	90,0	88,7	91,9	87,3
Дополнительно дозволённые области	9,5	10,8	7,6	12,3
Обычно дозволённые/недозволённые области	0,5	0,5	0,5	0,4

<sup>a</sup>Оболочка высокой разрешающей способности в круглых скобках

**Таблица 1 продолжение. Сбор данных и статистических уточнений**

Комплекс	6	7	8	10R
PDB коды	4Q1C	4Q1D	4Q1E	4Q1F
Статистика сбора				

**данных**

Источник рентгеновского излучения и детектор	LS-CAT ID-G MARCCD 300	Rigaku RU-200 R-Axis IV ++	Rigaku RU-200 R-Axis IV ++	Rigaku RU-200 R-Axis IV ++
Длина волны (Å)	0,9785	1,5418	1,5418	1,5418
Температура (К)	100	93	93	93
Разрешающая способность <sup>a</sup> (Å)	2,0 (2,12-2,00)	2,0 (2,12-2,00)	1,85 (1,96-1,85)	2,1 (2,23-2,10)
Количество рефлексов				
Наблюдаемое	194108	144843	158177	175767
Уникальное	36902	37712	46762	32727
Полнота ( %)	98,8 (96,1)	99,5 (98,5)	96,9 (82,8)	99,5 (98,7)
R <sub>sym</sub> ( %)	5,1 (71,6)	3,3 (67,1)	2,8 (40,4)	4,3 (75,6)
Среднее I/σ(I)	16,57 (2,04)	19,38 (1,79)	21,62 (1,99)	21,66 (2,12)
Пространственная группа	P4 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub>	P4 <sub>1</sub>
Элементарная ячейка (Å): a=b, c	68,66, 119,27	68,73, 120,62	68,74, 122,20	68,78, 121,28
<b>Статистика уточнений</b>				
Уточняющая программа	Refmac5	Refmac5	Refmac5	Phenix 1,8,4
Доля удвоений	0,5	0,5	0,5	0,5
R <sub>крит.</sub> ( %)	20,5	19,1	17,4	20,3
R <sub>св.</sub> ( %)	23,8	25,3	21,8	23,1
Диапазон разрешающей способности (Å)	30-2,0	30-2,0	30-1,85	30-2,1
Молекулы белка на ат.ед.	2	2	2	2
<b>Число атомов:</b>				
Белок (белА, белВ)	1897, 1870	1890, 1842	1905, 1904	1897, 1897
Молекулы воды	109	92	185	170
Ингибитор	32 x2	31 x2	29 x 4	33 x 2

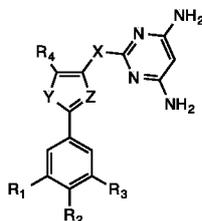
UDP	25 x 2	25 x 2	25 x 2	25 x 2
R.m.s. отклонение от идеального:				
Длина связи (Å)	0,012	0,011	0,013	0,006
Углы связи (°)	1,72	1,68	1,67	1,03
Среднее B-факторс (Å <sup>2</sup> )				
Белок (белА, белВ)	29,5, 29,5	51,8, 51,8	37,6, 39,2	47,8, 48,7
Молекулы воды	29,3	46,8	38,4	44,2
Ингибитор				
белА (301, 302)	29,4, -	55,8, -	43,1, 44,5	47,3, -
белВ (301, 302)	29,5, -	52,8, -	40,0, 48,5	54,5, -
UDP (белА, белВ)	29,6, 29,5	53,3, 53,6	38,5, 39,4	49,8, 51,2
Карта Рамачандрана (%)				
наиболее предпочтительные области	91,6	89,2	90,3	88,6
Дополнительно дозволённые области	8,4	10,3	9,2	10,9
Обычно дозволённые/недозволённые области	0,5	0,5	0,5	0,5

<sup>a</sup>Оболочка высокой разрешающей способности в круглых скобках

**[0329]** Соединение без заместителей в фенильном кольце, но иначе идентичные соединению **1a**, показали скромную эффективность в нашем СЕМ анализе, основанном на клетках (IC<sub>50</sub> 37 нМ<sup>8</sup>). Добавление гидроксильной группы в мета-положении, снижало IC<sub>50</sub> в таком анализе приблизительно в половину (соединение **3**, предварительно соединение **31**<sup>3</sup>, **Фигура 3**). Добавление более длинной гидроксизетокси группы в таком положении (соединение **4**, предварительно соединение **32**<sup>3</sup>), давало IC<sub>50</sub> ~1 нМ (**Фигура 3**). Первичные гидроксилы, как в **4**, являются склонными к окислению или глюкуронидации,<sup>12</sup> но данные исследования информируют нас насколько важен тип заместителя в мета-положении фенила.

**[0330]** Для того, чтобы понять различие в аффинностях dСК между соединениями **3** и **4**, мы определили структуры dСК в комплексе с данными молекулами, разрешали при разрешающей способности 2,09 Å и 1,9 Å, соответственно (**Таблица 1**). Структуры обнаруживают, что гидроксиэтокси группа, как присутствует в соединении **4**, взаимодействует с боковыми цепями Ser144 и Ser146, в свою очередь, гидроксильная группа в том же положении в соединении **3** находится слишком далеко, чтобы сделать какие-либо взаимодействия ингибитор-фермент (**Фигура 3С и Фигура 11**). Мы относим данное дополнительное взаимодействие к верхнему связыванию соединения **4** по сравнению с соединением **3**.

**[0331]** Исходя из важности заместителей в мета-положении фенила, ясно, что отсутствие или наличие короткого заместителя, такого как гидроксил (соединение **3**) уменьшает взаимодействие с dСК. С другой стороны, аффинность связывания, измеряемая как в кинетическом анализе *in vitro*, так и в анализе на основе СЕМ клеток более длинные заместители – как присутствующие в соединениях **Ia**, **Ib** и **4** – являются сопоставимыми. Предшествующие кристаллические структуры dСК в комплексе с соединением **Ia** (PDB ID 4L5B) и **Ib** (PDB ID 4KCG) также показывают взаимодействие между заместителями в мета-положении фенила и ферментом – данный момент с Ser144. Дополнительные боковые цепи, такие как 2-фторэтокси поли(этиленгликоль) (n=2) (ПЭГ)<sub>2</sub> (**S16**, **S17**, **S19**), 2-гидроксиэтил (ПЭГ)<sub>2</sub> (**S11**), 2-метоксиэтил (ПЭГ)<sub>2</sub> (**S20**, **S22-23**, **S25-28**, **S29**), и 2-(4,6-диаминопиримидин-2-тио)этил (ПЭГ)<sub>2</sub> (**S10**) заместители, хорошо допускались в мета-положении (**Таблица 3**).

[0332] Таблица 3. In vitro биологические данные в СЕМ клетках для соединений S1-S31<sup>a,b</sup>

Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Y	Z	X	IC <sub>50</sub> (нМ)
<b>S1 DI-47</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CD <sub>2</sub> S	4.0 (±2.2)
<b>S2 DI-50</b>	H	Прим. <sup>c</sup>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHSO <sub>2</sub> Me	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	1,200(±312)
<b>S3 DI-51</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	2.5 (±0.35)
<b>S4 DI-52</b>	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	2.8 (±1.6)
<b>S5 DI-53</b>	H	F	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	31.7(±11.9)
<b>S6 DI-54</b>	H	F	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	23.3 (±13)
<b>S7 DI-55</b>	H	H/A <sup>d</sup>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	6.8 (±1.7)
<b>S8 DI-56</b>	H	H/A <sup>d</sup>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CD <sub>2</sub> S	30 (±4)
<b>S9 DI-57</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CD <sub>2</sub> S	3.1 (±1.1)
<b>S10 DI-58</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> X <sup>e</sup>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	4.7 (±1.6)
<b>S11 DI-59</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	1.06 (±0.15)
<b>S12 DI-60</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	CH <sub>3</sub>	O	C	CH <sub>2</sub> S	13,840(±280)
<b>S13 DI-61</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHSO <sub>2</sub> Me	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CD <sub>2</sub> S	3.04 (±0.704)
<b>S14 DI-62</b>	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	O	C	CH <sub>2</sub> S	276 (±179)
<b>S15 DI-64</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	664 (±360)
<b>S16 DI-65</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	4.22 (±1.98)
<b>S17 DI-66</b>	H	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	69.08 (±46.41)
<b>S18 DI-67</b>	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	S	C	CH <sub>2</sub> S	262 (±150)
<b>S19 DI-69</b>	F	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> F	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	33.68 (±3.59)
<b>S20 DI-70</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	3.31 (±0.44)
<b>S21 DI-71</b>	H	Прим. <sup>f</sup>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	2.37 (±0.44)
<b>S22 DI-73</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	N	CH(CH <sub>3</sub> )S	6.0 (±2.4)
<b>S23 DI-74</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	S	N	CH(CH <sub>3</sub> )S	8.03 (±3.16)
<b>S24 DI-76</b>	H	Прим. <sup>f</sup>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	S	N	CH(CH <sub>3</sub> )S	6.1 (±3.2)
<b>S25 DI-77</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	Ср <sup>g</sup>	S	N	CH <sub>2</sub> S	23 (±20)
<b>S26 DI-79</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	S	N	CH <sub>2</sub> S	9.1 (n=1)
<b>S27 DI-80</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	Ср <sup>g</sup>	S	N	CH(CH <sub>3</sub> )S	3.7 (n=1)
<b>S28 DI-81</b>	H	OCH <sub>3</sub>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	Фенил	S	N	CH(CH <sub>3</sub> )S	98.9 (n=1)
<b>S29 DI-83</b>	H	Прим. <sup>h</sup>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	S	N	CH(CH <sub>3</sub> )S	61.4 (n=1)

<b>S30 D1-S4</b>	H	Прим. <sup>h</sup>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHSO <sub>2</sub> Me	CH <sub>3</sub>	S	N	CH(CH <sub>3</sub> )S	200.3(n=1)
<b>S31 D1-S5</b>	F	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHSO <sub>2</sub> Me	CH <sub>3</sub>	S	N	CH(CH <sub>3</sub> )S	9.07 (±2.24)

<sup>a</sup>Значения IC<sub>50</sub>, основанные на ингибировании захвата <sup>3</sup>H-дезоксцитидина (dCyd) в СЕМ клетках. Представленные значения являются средними ± SD, по меньшей мере, n = 2 независимых эксперимента. <sup>b</sup> Представленные значения для n = 1. <sup>c</sup>R<sub>2</sub>=N(SO<sub>2</sub>Me)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>Me). <sup>d</sup>2,4-дизамещенное пиридиновое кольцо. <sup>e</sup>3,5-диаминопиримидинтиол. <sup>f</sup>R<sub>2</sub>=O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>. <sup>g</sup>Cpr=циклопропил. <sup>h</sup>R<sub>2</sub>=OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>Me.

[0333] Определенная природа заместителя в мета-положении фенила может не быть критической, при условии, что он содержит полярную группу, которая может распространяться на близость Ser144/Ser146.

[0334] Мы получили соединение **5** (предварительно соединение **28**<sup>3</sup>), которое только отличается от соединения **Ib** отсутствием заместителя в пара-положении (Фигура 4A). Измеренные *in vitro* значения аффинности связывания (IC<sub>50</sub><sup>app</sup>; K<sub>i</sub><sup>app</sup>) соединения **5** почти идентичны тем, что у **Ib** (Фигура 4B). Это указывает на то, что заместители в пара-положении не требуются для сильного связывания, и объясняется кристаллическими структурами dСК в комплексе с соединениями **5** и **6** (предварительно соединение **30**<sup>3</sup>), что показывает почти идентичный способ связывания к тому, который также является очень подобным к наблюдаемому для соединения **Ib** (Фигура 4C и Фигура 12). Кристаллические структуры также обнаружили, что никакие значительные взаимодействия ингибитор-фермент не происходят через пара-заместитель, если он присутствует. Этот вывод подтверждается свойствами соединения **6**, которое, в отличие от метоксигруппы в соединениях **Ia** и **Ib**, имеет более длинную гидроксизтоксигруппу, но подобную аффинность связывания. Следовательно, *in vitro* аффинности связывания в значительной степени не изменяется между тем, как фенильная группа не имеет заместителя в пара-положении, имеет метокси, или более длинный гидроксизтоксигруппу. Тем не менее, мы обратили внимание на ~10-кратную разницу между соединениями **5** и **6** в анализе на основе СЕМ клеток, где соединение **5** является менее эффективным. Кроме того, заместители в пара-положении фенильного кольца, такие как 2-фторэтокси (**S4**, **S14**, **S18**), фтор (**S5**, **S6**), метоксиметил с терминальными (ПЭГ)<sub>2</sub> (**S21**, **S24**), и *N*-замещенный метансульфонамид (**S29**, **S30**) относительно хорошо переносятся (Таблица 3). Группы, присоединенные к тиазолу, такие как заместители 4-пиридинил (**S7**), мета-монозамещенный фенил (**S17**), и 3,5-дизамещенное фенильное кольцо (**S31**), также

допускались (**Таблица 3**). Таким образом, тогда как нет явного предпочтения для аффинности связывания, наличие даже небольшого заместителя в пара-положении фенильной группы улучшает соответствующие измерения на основе клеток. В результате, большинство последующих соединений содержали метокси группу в этом положении.

**[0335]** Мы продемонстрировали, что природа заместителя в 5-положении тиазольного кольца (часть C молекулы, **Фигура 1A**) играет ключевую роль в аффинности связывания.<sup>9</sup> Короче говоря мы сравнивали те, которые не имеют заместителя в положении, с теми, которые имеют метил, этил или пропил. Именно последним является то, значительно улучшило аффинность связывания, и в результате, соединения с пропилом в 5-положении стали соединения-прототипы (т.е. соединение **Ia, Ib, Фигура 1**). Интересно отметить, что соединения с небольшим заместителем/без заместителя в 5-положении тиазола, как наблюдалось, связывали две молекулы ингибитора на dCK активный сайт. В отличие от этого, наблюдалось, что прочное связывающиеся пропилом-содержащие молекулы связывались с одной молекулой ингибитора на dCK активный сайт.<sup>9</sup> В нашем предыдущем сообщении мы обсуждаем вовлечение одинарного/двойного связывания молекул ингибитора с dCK; короче говоря, мы приходим к выводу, что связывание двух молекул не требуется для сильного связывания, и что молекула ингибитора, связанная с тем, что мы называем как положение-1, является ответственной за наблюдаемое ингибирование активности dCK, в свою очередь, молекула, связанная в положении-2, значительно не повышает ингибирование dCK.

**[0336]** Тем не менее, при исследовании метаболической стабильности, мы обнаружили, что содержащие пропильную группу соединения **Ia** и **Ib** являются менее стабильными по сравнению с теми, которые имеют более короткую метильную группу, например, соединение **15a**. (**Таблица 2**). Мы также исследовали активность циклопропильных и фенильных групп в 5-положении тиазолила (**Таблица 3**). Циклопропильный аналог (**S27**) имел хорошее значение  $IC_{50}$ , но оно падало в PET L-FAC анализе, который описан в <sup>8</sup>. Фенильный аналог (**S28**) продемонстрировал низкую аффинность. Поэтому мы были вынуждены вернуться к тиазольному кольцу с метильным заместителем несмотря на более слабое взаимодействие с dCK. Для того, чтобы компенсировать потерю аффинности, которая обеспечивается пропильной группой тиазола, мы искали модификации для компенсации, что должно восстановить *in vitro* аффинность связывания и в то же время поддерживать приемлемую метаболическую стабильность. С

этой целью мы решили исследовать модификации в фрагменте линкера (часть В соединений, **Фигура 1А**).

**Таблица 2: Анализ человеческого микросомального внутреннего клиренса <sup>a</sup>**

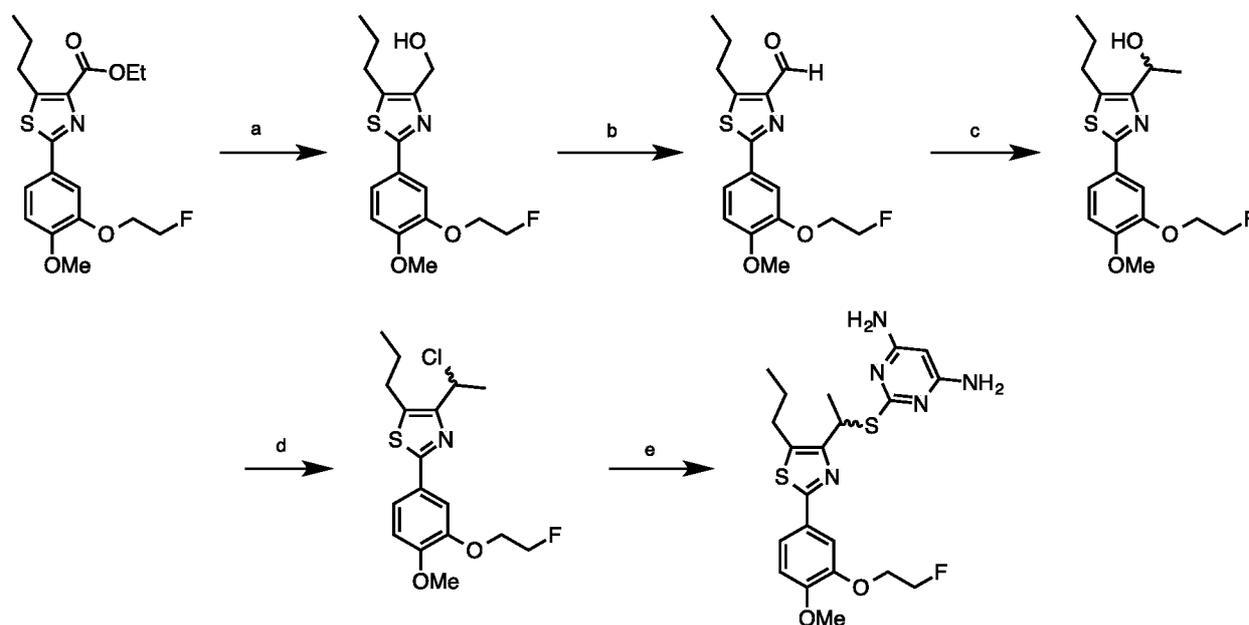
Соединение	NADPH- зависимый CL <sub>int</sub> <sup>a</sup> (мкл хв <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> )	NADPH- зависимый T <sub>1/2</sub> <sup>b</sup> (хв)	Комментарии
Верапамил	201	11,5	Контроль с высоким клиренсом
варфарин	0,0	>240	Контроль с низким клиренсом
<b>Ia</b>	561	4,1	
<b>Ib</b>	870	2,7	
<i>15a</i> (Murphy et al)	142	16,3	
<b>7(R/S)</b>	419	5,5	
<b>8(R/S)</b>	254	9,1	
<b>10R</b>	22,7	102	

<sup>a</sup>Исследуемая концентрация соединений составляла 1 мкМ

**[0337]** Группа  $-S-CH_2-$  действует для связывания пиримидинового и тиазольного колец наших соединений. Мы исследовали множество различных линкеров, таких как его дейтерированный аналог ( $-S-CD_2-$ ) с целью кинетического исследования изотопов. Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, мы предположили, что если линкер был вовлечен в гидролитический метаболизм то, из-за кинетического изотопного эффекта, дейтерированный ( $-S-CD_2-$ ) аналог будет показывать улучшение в метаболической стабильности. Дейтериевые аналоги (**S1, S8, S9, S13**) имели аффинность аналогичную их изотопологам, как ожидалось (**Таблица 3**). Однако, дейтерированные соединения не показали улучшение в анализе печени PET L-FAC, указывая на то, что гидролитический механизм, вероятно, не участвует в метаболизме  $-S-CH_2-$  линкер. Мы также исследовали

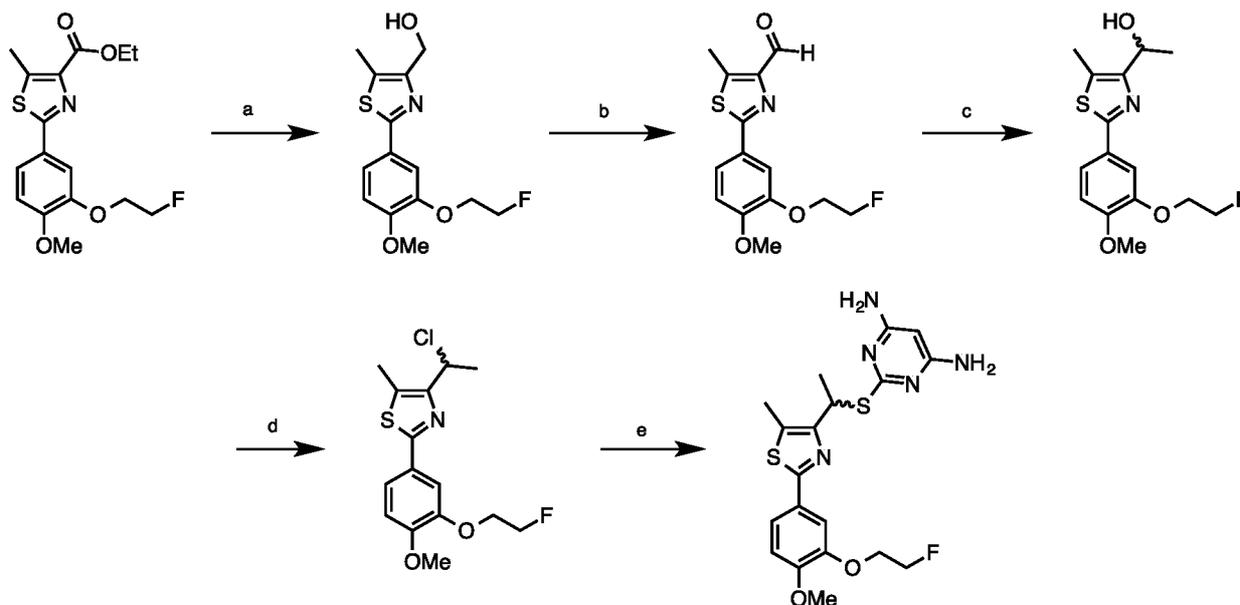
замещение атома серы в группе  $-S-CH_2-$  с метиленовой группой ( $-CH_2CH_2-$ ). Замещение атома серы линкера на атом углерода в результате приводило к снижению аффинности dСК и метаболической стабильности (Таблица 3). Мы исследовали линкер, в котором метилен был замещен, чтобы содержать метильную группу ( $-S-CH(CH_3)-$ ). Данные рацемические с метильным линкером соединения показали обнадеживающие биологические результаты и повышенную метаболическую стабильность (см. Схему 1 и Схему 2 для синтеза соединений 7 и 8). Таким образом, мы тщательно изучили синтетический путь в попытке уменьшить стадии синтеза и улучшить общий выход. Нам удалось разработать шестистадийный синтетический путь в направлении 9 с общим выходом 43 % (Схема 3). Коммерчески доступный 3-гидрокси-4-метоксибензонитрил А подвергли действию водного раствора сульфида аммония в щелочных условиях с получением тиоамида В. Циклизация с образованием тиазольного ядра С достигалась за счет конденсации тиоамида В с 4-бромпентан-2,3-дионом<sup>13</sup> в кипящем этаноле. Введение ПЭГ цепи в фенильное кольцо соединения D с 13-хлор-2,5,8,11-тетраоксатридеканом<sup>14</sup> в основных условиях достигалось с 89 % выходом. Восстановление полученного в результате кетон-содержащего соединения диизобутилалюмогидридом (DIBAL-H) дает рацемический вторичный спирт E с высоким выходом. Спирт E превращали в соответствующий хлорид F используя тионилхлорид. Ацилхлорид подвергли реакции в сыром виде с 4,6-диамино-2-меркаптопиримидином с образованием продукта 9R/S.

[0338] Схема 1. Способ синтеза рацемического соединения 7 с метильным линкером.



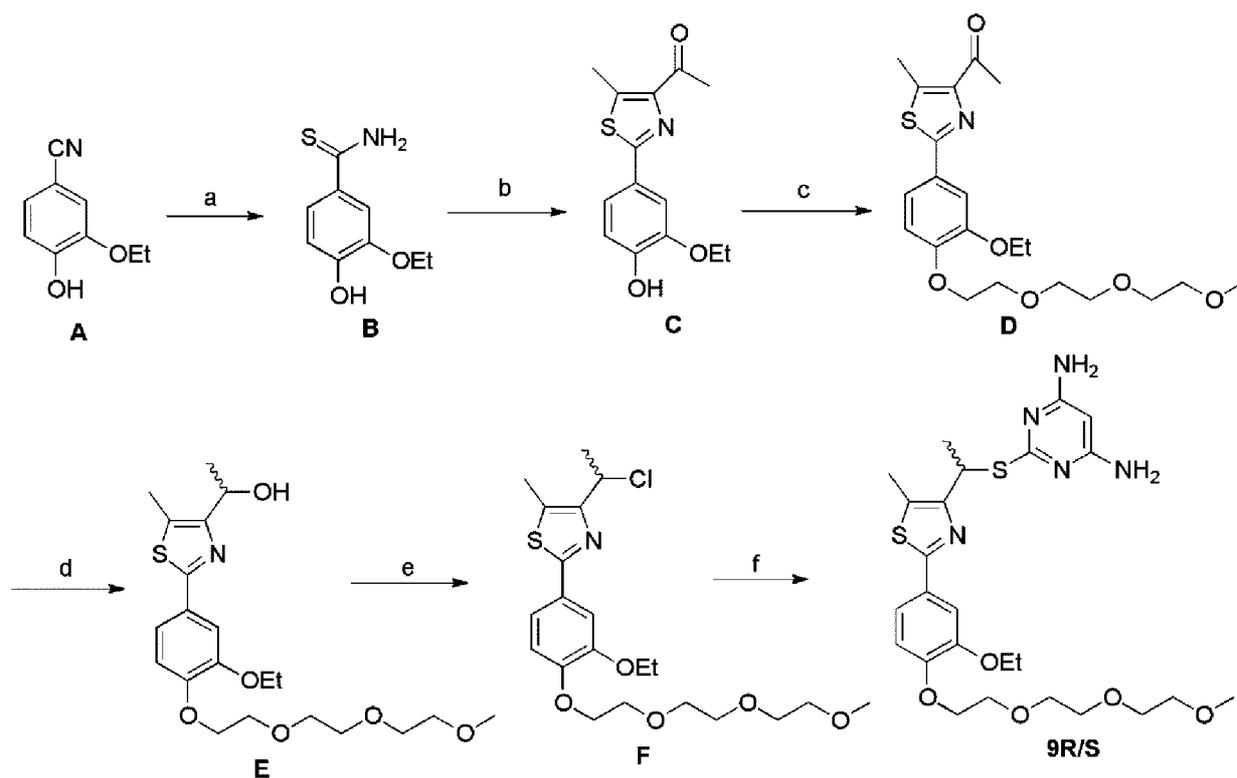
**[0339]** Реагенты и условия: (a) Диизобутилалюмогидрид, тетрагидрофуран, (предыдущая работа); (b) периодат Десса-Мартина, дихлорметан, 23 °С, 80 %; (c) метилмагния йодид, тетрагидрофуран, 0 °С, 86 %; (d) Тионилхлорид, дихлорметан, 23 °С, 96 %; (e) 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин, калия карбонат, ДМФ, 80 °С, 66 %.

**[0340]** Схема 2. Способ синтеза рацемического соединения 8 с метильным линкером



**[0341]** Реагенты и условия: (a) Диизобутилалюмогидрид, тетрагидрофуран, (предыдущая работа); (b) периодат Десса-Мартина, дихлорметан, 23 °С, 70 %; (c) метилмагния йодид, тетрагидрофуран, 0 °С, 68 %; (d) тионилхлорид, дихлорметан, 23 °С, 94 %; (e) 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин, калия карбонат, ДМФ, 80 °С, 64 %.

**[0342]** Схема 3. Способ синтеза соединения 9R/S с метильным линкером



[0343] Реагенты и условия: (a)  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  (20 % в  $\text{H}_2\text{O}$ ), пиридин,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $60^\circ\text{C}$ , 85 %; (b) 4-бромпентан-2,3-дион,  $\text{EtOH}$ , кипячение, 95 %; (c) 13-хлор-2,5,8,11-тетраоксатридекан,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , ДМФ,  $50^\circ\text{C}$ , 89 %; (d) DIBAL-H, ДХМ,  $-78^\circ\text{C}$ , 92 %; (e)  $\text{SOCl}_2$ , ДХМ,  $0^\circ\text{C}$  до к.т.; (f) 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , ДМФ,  $75^\circ\text{C}$ , 65 % за последние две стадии.

[0344] Линкер  $-\text{S}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$  вводили в соединение, которое содержало пропильную группу в 5-положении тиазольного кольца (соединение 7), и в соединение, которое вместо пропильной группы содержало метил (соединение 8) – **Фигура 5A**. Как упоминалось выше, логическим объяснением соединения 8 было предсказанное улучшение метаболической стабильности. Интересно отметить, что, в свою очередь, ранние соединения с пропил-тиазольным кольцом показали прочное связывание с dCK по сравнению с аналогичными метил-тиазольными соединениями, сейчас мы измерили лучшее связывание с метил-содержащим соединением 7 по сравнению с пропил-содержащим соединением 8 (**Фигура 5B**). Следовательно, близость заместителя тиазольного кольца (пропила или метила) к заместителю метил-линкера в результате приводила к тому, что большая пропильная группа не являлась столь приспособляющейся в активном сайте dCK. Несмотря на улучшенные *in vitro* параметры связывания для 8 по сравнению с 7, анализ на основе клеток дал подобные

значения  $IC_{50}$ , при этом согласующийся с тем, что **8** является превосходящим (**Фигура 5B**).

[0345] Оба соединения **7** и **8** получали как рацемические смеси; введенный линкер - метильная группа делает такое положение новым хиральным центром (стрелка, **Фигура 5A**). Для того, чтобы оценить какой из двух энантиомеров является активным ингибитором dCK мы определили кристаллическую структуру dCK в комплексе с соединениями **7** и **8** (установленную с разрешающей способностью 2,0 Å и 1,85 Å, соответственно, **Таблица 1**). Соединение **7** связывает, как с единственной молекулой, с dCK, специфически в Положение-1. Интересно отметить, что несмотря на тот факт, что рацемическую смесь **7** использовали для формирования комплекса с dCK, кристаллическая структура обеспечивает однозначное доказательство связывания R-изомера в Положении-1 (**Фигура 5C и Фигура 13**). Аналогичным образом, критическое рассмотрение структуры комплекса между рацемическим **8** и dCK показывает, что это R-изомер, который занимает наиболее соответствующее Положение-1 сайта связывания (**Фигура 5D и Фигура 13**). Поскольку соединение **8** содержит метильный заместитель в тиазольном кольце, который позволяет молекуле также занимать Положение-2, в действительности мы также наблюдаем соединение **8** в том положении. Тем не менее, в свою очередь, R-изомер **8** является таким, что связывается с Положением-1, S-изомер является таким, что связывается с Положением-2 (**Фигура 5E и Фигура 13**).

[0346] Положение-1 может представлять собой сайт связывания для данного семейства ингибиторов. Это позволило бы предположить, что измеренные *in vitro* значения ингибирования рацемического **8** отражают преимущественное связывание R-изомера. Для проверки данного предположения, мы синтезировали соединение **9**, которое представляет собой небольшую модификацию **8** (природа заместителей фенильной группы), но прежде всего, имело рацемическую смесь, которую разделяли с получением чистых изомеров **9R** и **9S** (**Фигура 6A**). Мы определили *in vitro* аффинности связывания энантиомерно чистых соединений и наблюдали, что **9S** имеет в ~400-раз более слабую аффинность связывания по сравнению с **9R** (**Фигура 6B**). В дополнение к предоставляемым четким доказательствам, что R-форма является такой, что ответственна за тесное взаимодействие с dCK, этот результат также подтверждает нашу интерпретацию на основе структуры, что Положение-1 является одним наиболее соответствующим сайтом связывания ингибитора для ингибирования dCK, и где Положение-2 занимает из-за высокой концентрации ингибитора, использованного при формировании кристаллизации.

[0347] Обнаружив то, что R-изомер соединений **7**, **8** и **9** выступает ответственным за ингибирование dCK, мы намереваемся разработать ассиметричный синтез (Схема 2). Хиральный синтез, разработанный нашей группой для соединения **10R**, которое является близким аналогом **8**, показывает хиральную реакцию Кори-Бакши-Шибата (CBS)<sup>15</sup> кетона **D**. Хиральными спирт **E** синтезировали в соответствии с данным способом с энантиомерным избытком 96 %, как определено с помощью хиральной ВЭЖХ. Используя метансульфоновый или тозилсульфоновый ангидрид, чтобы получить сульфонаты в разных основных условиях, таких как Et<sub>3</sub>N, пиридин или DMAP, в результате приводила к устранению алкена, предположительно из-за стабильности вторичного бензильного типа карбокатиона. Использование трифторуксусного ангидрида (ТФУА) при 0 °С преобразовывало спирт **E** в соответствующий трифторацетат (ТФУ) **F** без существенного снижения % э.и. сложного эфира. В заключение, соединение **F** подвергли взаимодействию с 4,6-диамино-2-меркаптопиримидином, получая **10R** с 61 % выходом после двух стадий с энантиомерным избытком 40 %. Предположительно, часть реакции осуществляется за счет прямого SN<sub>2</sub> пути, в то время как другая часть осуществляется за счет SN<sub>1</sub> пути, и, таким образом, получали частично рацемизированный материал. Хиральное разделение с помощью перекристаллизации генерировало **10R** с энантиомерным избытком более 90 %. Аналогичным образом, (S)-(-)-2-метил-CBS-оксаборолидин использовали в восстановлении CBS, чтобы синтезировать **10S**.

[0348] Соединение **10R** (Фигура 6A), как измерено, имеет очень сходные *in vitro* аффинности связывания, как и **9R** (Фигура 6B). Важно отметить, что, точно также, как аффинность **9S** была значительно снижена по сравнению с **9R**, аффинность к dCK **10S** была значительно снижена по сравнению с **10R**. Это подтвердило преимущество dCK для соединений, которые содержат R-изомер линкера.

[0349] Мы установили кристаллическую структуру комплекса dCK-**10R**. На основании предыдущей структуры с соединением **9** (наблюдая **9R**, связанную с Положением-1) и наши кинетические результаты с использованием энантиомерно чистых **9S**, **9R**, **10S** и **10R** (наблюдая более высокую аффинность для R-изомеров), и так как кристаллы были образованы с энантиомерно чистым **10R**, мы ожидали, что **10R** связывается только в Положении-1. Кроме того, при отсутствии S-изомера, мы ожидали, что вакантное Положение-2 сайта связывания. В действительности, кристаллическая структура комплекса dCK-**10R** показал одну молекулу ингибитора в Положении-1 (Фигура 6C). Этот результат предполагает, что R-изомер имеет очень низкую аффинность к сайту

связывания в Положении-2. Примечательно, что в то время как взаимодействие между R-изомером и dСК ограничивается сайтом связывания Положения-1, это не уменьшает аффинность связывания для фермента.

**[0350]** Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией мы выдвинули гипотезу стерические факторы, касающиеся ингибитора и фермента, где хиральная метильная группа линкера сталкивается с ферментными остатками в случае одного изомера, но не другого обеспечивающего эффективность. Тем не менее, критическое рассмотрение установленных кристаллических структур с соединениями **8(R/S)** и **10R** не поддерживает данную интерпретацию; мы могли бы моделировать S-изомер, связанный с Положением-1 (**Фигура 5D**), и R-изомер, связанный с Положением-2 (**Фигура 5E**), не имеющий видимых столкновений.

**[0351]** Сравнение способа связывания между **8R** и **8S** показывает, что относительные ориентации колец сильно отличаются (**Фигура 14**). Другими словами, каждый изомер регулировал свою конформацию к наилучшим образом подходящему своему сайту связывания (т.е. индуцированная подгонка). Это предполагает, не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, что фермент диктует относительные ориентации между пиримидиновым кольцом, линкером, тиазольным кольцом и фенильным кольцом. Мы рассмотрели теоретическую модель S-изомера, которая ориентируется тем же образом, как и **8R**. В действительности, где для **8R** в Положении-1, наблюдаемое расстояние между хиральным метилом линкера и метильной группой тиазольного кольца составляет 4,2 Å (**Фигура 7A**), для моделированного **8S**, связанного с Положением-1, такое расстояние 2,5 Å будет неблагоприятным (**Фигура 7B**). Аналогичным образом, в свою очередь для **8S** в Положении-2 наблюдаемое расстояние между хиральным метилом и метилом тиазола составляет 4,4 Å (**Фигура 7C**), для моделированного R-изомера, принимающего такую же конформацию как **8S**, такое расстояние 2,6 Å будет неблагоприятным (**Фигура 7D**). Следовательно, точный хиральный выбор или Положения-1, или Положения-2 имеет место из-за фермента, диктующего конкретную ориентацию ингибитора, которая значительно отличается между сайтами связывания. В случае Положения-1, когда ориентация не является совместимой с S-изомером, и для Положения-2, когда ориентация не является совместимой с R-изомером.

**[0352]** Используя компьютерные моделирования, мы получаем качественную оценку конформационного штрафа, за которое несли ответственность **8R** и **8S** после связывания с

белком. Конформационное пеналти представляет собой разницу энергии между предпочтительной геометрией раствор-фаза субстрата и геометрии, которую он принимает при связывании:  $\Delta E = E_{\text{раствор}} - E_{\text{связыванный}}$ . Каждый энантиомер состыковался со сольватированным белком в Положении-1 и давали уравновесить (см. детали в экспериментальной части и **Фигура 15**). Уравновешенные, состыкованные структуры ингибитора были удалены из белка, и их энергии были оценены с помощью полуэмпирического PDDG/PM3 способа<sup>16-21</sup>. Несвязанные структуры **8R** и **8S** были оптимизированы в неявном растворителе, чтобы определить их низкоэнергетические конформации раствор-фаза. Как и в случае связанных структур, энергии несвязанных структур были оценены с использованием PDDG/PM3. Полученные в результате энергии использовали для получения качественных конформационных пеналти для каждого энантиомера. Конформационный пеналти для **8S** был почти удвоенным конформационным пеналти для **8R** (на 45 ккал/моль больший пеналти для **8S**), далее демонстрируя, что **8R** должен испытывать намного меньшую неблагоприятную структурную перестройку для того, чтобы связать с белком.

**[0353]** Другой способ рассмотрения данного вопроса заключается в исследовании энергии ингибитора как функции вращения вокруг связи, которая соединяет тиазольное кольцо с хиральным атомом линкера (связь, обозначенная \* на **Фигуре 7A-D**). Для **8R**, связанного с dCK в Положении-1, наблюдаемый торсионный угол, который указывает данное вращение, составляет  $-59^\circ$ , и посадки низкоэнергетической конформации (**Фигура 7E**). В отличие от этого, моделированный S-изомер в данном сайте связывания должен иметь торсионный угол  $189^\circ$ , который является явно высокоэнергетической конформацией (**Фигура 7F**). Та же картина наблюдается и для Положения-2; S-изомер связывается с dCK с торсионным углом  $-326^\circ$ , который является низкоэнергетической конформацией, тогда как моделированный R-изомер в таком положении является высокоэнергетической конформацией (**Фигура 7H**). Следовательно, хиральная селективность не идет непосредственно от фермента стерически в пользу одного изомера над другим. Скорее всего, фермент диктует конкретную конформацию, и селективность идет от одного изомера, который способен утверждать, что конкретная конформация, в свою очередь, энергетический пеналти другого изомера устраняет его связывание.

**[0354]** В дополнение к объяснению хиральной селективности для соединений, обсуждаемых здесь, это понимание может быть использовано для создания хиральных молекул, которые связываются с каким-либо сайтом связывания. В частности,

предсказание было бы таким, что замещение метильной группы тиазола на атом водорода будет исключать какое-либо стерическое столкновение с хиральной метильной группой, и, следовательно, какой-либо изомер может связываться с каким-либо сайтом связывания ингибитора.

**[0355]** Мы определили метаболическую стабильность **10R** в стандартном микросомальном анализе клиренса печени. NADPH-зависимый  $T_{1/2}$  **10R** был в ~37 раз больше, чем у нашего предыдущего соединения-прототипа **Ib** (Таблица 2). Мы затем тестировали соединение **10** у мышей, используя предварительно описанный анализ позитронно-эмиссионной томографии (PET).<sup>8</sup> В свою очередь, более раннее соединение-прототип **Ib** сохраняло только ~25 % ингибирования активности dCK через 4 часа после дозирования соединения **10** путем внутрибрюшинной инъекции<sup>3</sup> (данной как рацемическая смесь), которое десонстрировано >50 % ингибирование активности dCK в данной точке времени (Фигура 8A). Кроме того, через 8 часов после обработки соединением **10**, ингибирование dCK было еще выше 30 %. Затем мы определили фармакокинетические свойства соединения **10**, чтобы сравнить с нашими предыдущими соединениями-прототипами **Ia** и **Ib**.<sup>7, 8</sup> Как показано на Фигуре 8B, фармакокинетические свойства соединения **10** были значительно улучшены по сравнению с предварительно опубликованными значениями для соединений **Ia** и **Ib**.<sup>7, 8</sup> В совокупности, данные полученные результаты демонстрируют, что введение хирального линкера плюс замещения пропильного заместителя тиазольного кольца на метильную группу дает ингибитор dCK с улучшенной метаболической стабильностью.

**[0356]** Исследование структуры и ингибирования, проведенные с использованием как очищенного рекомбинантного фермента, так и анализа на основе клеток, соединений, обсуждаемых здесь, показали и логически обосновали основные детерминанты для связывания с dCK, и также направляли тип и расположение заместителей. Это уведомяло развитие исходных выводов, соединений **Ia** и **Ib**. Данные соединения содержат пропильную группу в 5-положении тиазольного кольца, поскольку, как показано ранее, пропильный заместитель обеспечивает улучшенную аффинность для dCK по сравнению с соединениями с метильной группой в положении. Данная пропильная группа, усиливающая аффинность, поступалась метаболической стабильностью по сравнению с соединениями, содержащими метильную группу в таком положение. Это заставило нас вернуться к более слабому связыванию, но более метаболически стабильному остову метильной группы в тиазольном кольце. С целью улучшения метаболическую

стабильность, испытывали хиральный метилен метил серы линкер между тиазола и пиримидиновых остатков. С целью улучшения метаболической стабильности, исследовали хиральный метилсера метиленовый линкер между тиазольными и пиримидиновыми фрагментами. Данный линкер, как обнаружено, предоставляет два положительных эффекта: один, исходя из аффинности к dCK, модифицированный линкер компенсировал отсутствие пропильной группы тиазола, и два, соединения демонстрировали улучшенную метаболическую стабильность. Взаимодействие dCK с соединениями, содержащими данный линкер, является специфическим для R-изомера. Это было доказано с помощью кристаллической структуры dCK-ингибитор и с помощью сравнения аффинности связывания R по отношению к S энантиомерам. Новое соединение-прототип **10R** является перспективным ингибитором dCK, который путем пертурбации dNTP пулов и индуцирования перегрузки стресс репликации ДНК может быть использован в комбинации с другими лекарственными средствами, чтобы специально инициировать синтетическую летальность в раковых клетках.

**[0357] Материалы.** Общие лабораторные реагенты были приобретены у Fisher (Pittsburgh, Pennsylvania, США) и Sigma–Aldrich (St Louis, Missouri, США). Нуклеотиды были получены от Sigma. Все ингибиторы были синтезированы в UCLA. Chiral Technologies Inc. (800 North Five Points Road, West Chester, PA 19380 США) выполняли разделение R и S энантиомеров.

**[0358] Химия. Общие процедуры.** Если не указано иное, реакции проводили в высушенной в сушильном шкафу стеклянной посуде в атмосфере азота, используя коммерчески доступные безводные растворители. Растворители, используемые для экстракции и хроматографии не были безводными. 4,6-Диамино-2-меркаптопиримидин получали при высушивании гидрата при динамическом вакууме при 110 °C в течение 20 часов. Все другие реагенты, которые получали из коммерческих источников, были реагентами качества и использовали без дополнительной очистки, если не указано иное. Реакционные смеси и хроматографические фракции анализировали, используя тонкослойную хроматографию (ТСХ), используя Merck предварительно покрытые силикагелем 60 F<sub>254</sub> стеклянные пластины (250 мкм). Визуализацию осуществляли, используя ультрафиолетовый свет, ванилиновое окрашивание, окрашивание перманганатом, или окрашивание *n*-анисовым альдегидом. Флеш-колоночную хроматографию выполняли, используя E. Merck силикагель 60 (230-400 меш) с помощью сжатого воздуха. <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектры регистрировали на ARX500 (500 МГц), Avance500

(500 МГц) или Avance300 (300 МГц) спектрометрах. Химические сдвиги регистрировали в миллионных долях (м.д.,  $\delta$ ), используя пик остаточного растворителя как стандарт. Константы взаимодействия,  $J$ , представлены в Герцах (Гц) резонансные характеристики сообщаются с нотациями, как следующие: ш (широкий), с (синглет), д (дублет), т (триплет), кв (квартет), и м (мультиплет). Данные электроспрей масс-спектрометрии собирали с Waters LCT Premier XE времяпролетного устройства для измерения размера частиц контролировали, используя MassLynx 4,1 программное обеспечение. Образцы растворяли в метаноле и вводили, используя непосредственно петлевой инжектор от Waters Acquity UPLC в Multi-Mode источнике ионизации. Чистота всех конечных соединений, как определено, составляла >95 %. Аналитический анализ ВЭЖХ выполняли в Knauer Smartline ВЭЖХ системе с Phenomenex колонкой с обращенной фазой Luna (5 мкм, 4,6 × 250 мм) с встроенным УФ детектором Knauer (254 нм). Подвижная фаза: А: 0,1 % ТФУ в H<sub>2</sub>O, В: 0,1 % ТФУ в MeCN. Градиент элюента определяют для каждого описанного соединения. Процентные значения энантиомерного избытка ( % э.и.) определяли с помощью хиральной ВЭЖХ на CHIRALPAK®IA-3/IA колонке иммобилизованного типа на основе полисахарида (3 мкм, 4,6 × 150 мм) с встроенным УФ детектором Knauer (310 нм). Подвижная фаза: А: 0,1 % ТФУ в гексанах, В: 0,1 % ТФУ в пропанол. Градиент элюента: 50 % фазы А и 50 % фазы В. Хроматограммы собирали с помощью GinaStar (Raytest USA, Inc.; Wilmington, NC, USA) аналога цифрового преобразователя и GinaStar программного обеспечения (Raytest USA, Inc.).

**[0359]** Для схемы 1

**[0360]** **3-Этокси-4-гидроксибензотиоамид (В).** К смеси 3-этокси-4-гидроксибензонитрила **А** (2,50 г, 15,3 ммоль) в пиридине (35 мл) и триэтилаmine (2,5 мл) добавляли раствор сульфида аммония (20 % масс. в H<sub>2</sub>O, 15,65 мл, 46,0 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 60 °С. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель. Полученный в результате остаток промывали насыщенным соевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали в вакууме, и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (3:1 этилацетат: гексаны), получая **В** (2,56 г, 13,0 ммоль, 85 %) в виде желтого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,68 (д,  $J$  = 2,1 Гц, 1H), 7,48 (ш с, 1H), 7,28 (дд,  $J$  = 8,5, 2,1 Гц, 1H), 7,11 (ш с, 1H), 6,89 (д,  $J$  = 8,5 Гц, 1H), 6,03 (с, 1H), 4,21 (кв,  $J$  = 6,9 Гц, 2H),

1,47 (т,  $J = 6,9$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  200,5, 150,3, 145,8, 131,0, 121,0, 114,0, 112,6, 64,3, 14,1.

**[0361] 1-(2-(3-Этокси-4-гидроксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)этан-1-он (С).** Смесь тиоамида **В** (1,50 г, 7,6 ммоль) и 4-бромпентан-2,3-диона (2,04 г, 11,4 ммоль) в этаноле (40 мл) перемешивали в условиях кипячения в течение 4 ч. Полученную в результате смесь охлаждали и концентрировали *в вакууме*, чтобы удалить остаточный растворитель. Сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (10:3 гексаны:этилацетат), получая желаемое тиазольное промежуточное соединение **С** (2,00 г, 7,2 ммоль, 95 %) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,47 (д,  $J = 1,8$  Гц, 1H), 7,35 (дд,  $J = 8,2, 1,8$  Гц, 1H), 6,96 (д,  $J = 8,1$  Гц, 1H), 5,93 (с, 1H), 4,23 (кв,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 2,77 (с, 3H), 2,71 (с, 3H), 1,50 (т,  $J = 6,9$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (75 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196,0, 162,8, 148,9, 148,0, 146,3, 142,9, 125,9, 120,5, 114,8, 109,4, 64,9, 29,5, 14,9, 13,6.

**[0362] 1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этан-1-он (D).** К раствору тиазольного промежуточного соединения **С** (1,66 г, 6,0 ммоль) в ДМФ (35 мл) добавляли  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (3,13 г, 9,6 ммоль) и 13-хлор-2,5,8,11-тетраоксатридекан (2,19 г, 12,0 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 50 °С. После концентрирования, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате остаток промывали насыщенным соевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой три раза, сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали *в вакууме*, и сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (1:1 этилацетат: гексаны), получая желаемое кетон **D** (2,26 г, 5,3 ммоль, 89 %) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,48 (д,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 7,38 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1H), 6,94 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 4,24 – 4,20 (м, 2H), 4,17 (кв,  $J = 7,0$  Гц, 2H), 3,93 – 3,89 (м, 2H), 3,79 – 3,75 (м, 2H), 3,70 – 3,63 (м, 4H), 3,57 – 3,53 (м, 2H), 3,37 (с, 3H), 2,77 (с, 3H), 2,71 (с, 3H), 1,47 (т,  $J = 7,0$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196,0, 162,5, 150,8, 149,4, 149,0, 143,1, 126,9, 119,8, 114,0, 111,4, 72,1, 71,1, 70,8, 70,7, 69,7, 69,0, 64,9, 59,2, 29,5, 15,0, 13,6.

**[0363] 1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этан-1-ол (E).** К перемешиваемому раствору кетона **D** (1,06 г, 2,5 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (35 мл), охлажденного до -78 °С, медленно добавляли диизобутилалюмогидрид (1,0М в ТГФ, 10 ммоль, 10 мл). Реакционной смеси давали нагреться до 23 °С и перемешивали в течение 1 ч. Смесь охлаждали до 0 °С и медленно

гасили насыщенным водным раствором тартрата натрия-калия. Мутный раствор перемешивали в течение 1 ч при 23 °С пока раствор не стал снова прозрачным. Полученный в результате раствор экстрагировали этилацетатом, промывали насыщенным соевым раствором, сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали *в вакууме*, получая желаемый спирт **E** (978 мг, 2,3 ммоль, 92 %) в виде бледно-желтого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,44 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,33 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,89 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 4,91 (кв, J = 6,5 Гц, 1H), 4,22 – 4,17 (м, 2H), 4,13 (кв, J = 7,0 Гц, 2H), 3,91 – 3,86 (м, 2H), 3,76 – 3,72 (м, 2H), 3,69 – 3,61 (м, 4H), 3,55 – 3,51 (м, 2H), 3,35 (с, 3H), 2,37 (с, 3H), 1,52 (д, J = 6,0 Гц, 3H), 1,44 (т, J = 7,0 Гц, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 164,3, 155,1, 150,0, 149,0, 127,2, 125,8, 119,3, 113,8, 111,0, 71,8, 70,8, 70,6, 70,4, 69,5, 68,7, 64,6, 64,4, 58,9, 24,0, 14,7, 10,7.

**[0364] 4-(1-Хлорэтил)-2-(3-этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол (F).** К перемешиваемому раствору спирта **E** (425 мг, 1,0 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 мл) медленно добавляли тионилхлорид (0,78 мл, 10,0 ммоль) при 0 °С. Реакционной смеси давали нагреться до 23 °С и перемешивали в течение 1 ч. После концентрирования *в вакууме*, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате сырой остаток использовали непосредственно на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки из-за нестабильности хлорида **F**.

**[0365] 2-((1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин ((±)-9).** Смесь сырого хлорида **F** с предыдущей стадии, 4,6-диамино-2-меркаптопиримидина (625 мг, 4,0 ммоль) и K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (552 мг, 4,0 ммоль) в ДМФ (7 мл) перемешивали при 70 °С в течение 1 ч. Раствор охлаждали, концентрировали *в вакууме* и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (25:1 дихлорметан:метанол) получая желаемый продукт ((±)-9 (357 мг, 0,65 ммоль, 65 % за две стадии) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,49 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,35 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,90 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 5,24 (с, 1H), 5,02 (кв, J = 7,0 Гц, 1H), 4,58 (с, 4H), 4,22 – 4,18 (м, 2H), 4,15 (кв, J = 7,0 Гц, 2H), 3,91 – 3,87 (м, 2H), 3,78 – 3,75 (м, 2H), 3,69 – 3,63 (м, 4H), 3,56 – 3,53 (м, 2H), 3,37 (с, 3H), 2,50 (с, 3H), 1,81 (д, J = 7,0 Гц, 3H), 1,46 (т, J = 7,0 Гц, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 170,7, 163,8, 163,2 (2), 153,3, 149,9, 149,1, 127,9, 126,8, 119,4, 114,0, 111,3, 80,6, 71,9, 70,9, 70,7, 70,6, 69,7, 68,9, 64,7, 59,1, 37,7, 22,0, 14,8, 11,6; HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> H, 550,2158; найдено 550,2169.

[0366] Для схемы 2

[0367] **3-Гидрокси-4-метоксибензотиоамид (В).** К смеси 3-гидрокси-4-метоксибензонитрила **А** (3,00 г, 20,11 ммоль) в пиридине (30 мл) и триэтилаmine (3 мл) добавляли раствор сульфида аммония (20 % масс. в H<sub>2</sub>O, 20,7 мл, 60,3 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 60 °С. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали *в вакууме*, чтобы удалить остаточный растворитель. Полученный в результате остаток промывали насыщенным соевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали в вакууме, и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (3:1 этилацетат: гексаны), получая **В** (3,13 г, 17,1 ммоль, 85 %) в виде желтого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, Ацетон-d<sub>6</sub>) δ 8,77 (ш с, 1H), 8,65 (ш с, 1H), 7,85 (с, 1H), 7,59 (д, J = 2,5 Гц, 1H), 7,56 (дд, J = 8,5, 2,3 Гц, 1H), 6,94 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 3,88 (с, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, Ацетон-d<sub>6</sub>) δ 200,7, 150,5, 145,7, 132,4, 119,5, 114,8, 110,2, 55,5.

[0368] **1-(2-(3-Гидрокси-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)этан-1-он (С).** Смесь тиоамида **В** (2,75 г, 15,0 ммоль) и 4-бромпентан-2,3-диона (4,03 г, 22,5 ммоль) в этаноле (70 мл) перемешивали в условиях кипячения в течение 4 ч. Полученную в результате смесь охлаждали и концентрировали *в вакууме*, чтобы удалить остаточный растворитель. Сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (10:3 гексаны:этилацетат), получая желаемое тиазольное промежуточное соединение **С** (3,79 г, 14,4 ммоль, 96 %) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 9,53 (ш с, 1H), 7,34 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,26 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 6,98 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 3,80 (с, 3H), 2,66 (с, 3H), 2,57 (с, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 195,2, 162,5, 150,1, 148,5, 147,1, 142,7, 125,6, 118,2, 112,9, 112,5, 55,9, 29,4, 13,2.

[0369] **N-(2-(5-(4-ацетил-5-метилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокс)этил)метансульфонамид (D).** К раствору тиазольного промежуточного соединения **С** (1,58 г, 6,0 ммоль) в ДМФ (35 мл) добавляли Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,13 г, 9,6 ммоль) и *N*-(2-бромэтил)метансульфонамид (2,18 г, 10,8 ммоль). Смесь перемешивали в течение 72 ч при 50 °С. После концентрирования, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате остаток промывали насыщенным соевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой три раза, сушили над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали в вакууме, и сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (3:2 этилацетат: гексаны), получая

желаемый кетон **D** (1,89 г, 4,9 ммоль, 82 %) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,00 (с, 1H), 7,51 (д,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 7,46 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1H), 6,92 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 4,25 – 4,20 (м, 2H), 3,90 (с, 3H), 3,60 – 3,55 (м, 2H), 3,03 (с, 3H), 2,76 (с, 3H), 2,70 (с, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  195,8, 162,5, 151,5, 148,9, 147,8, 143,1, 126,4, 121,1, 112,4, 111,7, 69,1, 55,9, 42,7, 40,6, 29,4, 13,4.

**[0370] (S)-N-(2-(5-(4-(1-гидроксиэтил)-5-метилтиазол-2-ил)-2-**

**метоксифенокси)этил)метан-сульфонамид (E).** К перемешиваемому раствору (R)-(+)-2-метил-CBS-оксазаборолидина (6,7 мл 1,0 М раствора в толуоле, 6,7 ммоль) в ТГФ (26 мл) при  $-78$  °С в Аг добавляли комплекс боран-тетрагидрофуран (4,4 мл 1,0 М раствор в ТГФ, 4,4 ммоль), после чего раствор **D** (284 мг, 0,74 ммоль) в ТГФ (14 мл). После завершения добавления **D** раствор используя поршневой насос в течение 6 ч, реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 20 мин при  $-78$  °С. Добавляли  $\text{H}_2\text{O}$  (10 мл) и  $\text{MeOH}$  (5 мл), и смеси давали нагреться до комнатной температуры. После концентрирования, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате остаток промывали насыщенным соевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой три раза, сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали *в вакууме*, и сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию дважды на силикагеле с 3:2 этилацетат: гексаны, и 40:1 дихлорметан:метанол как систему промывания, отдельно получая спирт **E** (221 мг 0,57 ммоль, 77 %, э.и. 96 %) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  7,57 (д,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 7,46 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1H), 7,05 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 6,26 (ш с, 1H), 5,02 – 4,95 (м, 1H), 4,21 (т,  $J = 5,5$  Гц, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,57 (дт,  $J = 5,5, 5,5$  Гц, 2H), 3,04 (с, 3H), 2,48 (с, 3H), 1,50 (д,  $J = 6,0$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  162,9, 156,1, 151,3, 148,4, 127,1, 126,8, 119,7, 112,1, 111,4, 68,6, 64,1, 55,3, 42,6, 39,6, 23,0, 10,0.

**[0371] (S)-1-(2-(4-Метокси-3-(2-(метилсульфонамидо)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил 2,2,2-трифторацетат (F).** К перемешиваемому раствору спирта **E** (221 мг, 0,57 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (13 мл) медленно добавляли трифторуксусный ангидрид (0,66 мл, 2,9 ммоль) при 0 °С. После перемешивания при 0 °С в течение 30 мин, реакционной смеси давали нагреться до 23 °С и перемешивали в течение дополнительных 30 мин перед остановкой. После концентрирования *в вакууме*, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате сырой остаток использовали непосредственно на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки из-за нестабильности желаемого трифторацетата **F**.

**[0372]** (*R*)-*N*-(2-(5-(4-(1-((4,6-диаминопиримидин-2-ил)тио)этил)-5-метилтиазол-2-ил)-2-метоксифеноксид)этил)метансульфонамид (**10R**) и (*S*)-*N*-(2-(5-(4-(1-((4,6-диаминопиримидин-2-ил)тио)этил)-5-метилтиазол-2-ил)-2-метоксифеноксид)этил)метансульфонамид (**10S**). Смесь сырого хлорида **F** с предыдущей стадии и 4,6-диамино-2-меркаптопиримидина (112 мг, 0,86 ммоль) в ДМФ (5 мл) перемешивали при 80 °С в течение 1 ч. Раствор охлаждали, концентрировали *in vacuo* и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (25:1 дихлорметан:метанол), получая пару энантиомеров **10R** и **10S** (178 мг, 0,35 ммоль, э.и. 40 % **10R**, 61 % общий выход за две стадии) в виде белого твердого вещества. Перекристаллизация энантиомеров с системы растворителей MeOH\ацетон давала **10R** >93 % э.и. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, Ацетон-d<sub>6</sub>) δ 7,55 (д, *J* = 2,0 Гц, 1H), 7,48 (дд, *J* = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,06 (д, *J* = 8,5 Гц, 1H), 6,26 (ш с, 1H), 5,60 – 5,55 (м, 4H), 5,37 (с, 1H), 5,30 (кв, *J* = 7,0 Гц, 1H), 4,23 (т, *J* = 5,5 Гц, 2 H), 3,89 (с, 3H), 3,58 (дт, *J* = 5,5, 5,5 Гц, 2H), 3,05 (с, 3H), 2,52 (с, 3H), 1,74 (д, *J* = 7,0 Гц, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 168,0, 163,5 (2), 162,9, 153,6, 150,6, 147,8, 126,6, 126,2, 119,5, 112,3, 110,4, 79,0, 67,9, 55,7, 41,9, 36,1, 30,7, 22,2, 11,2; HRMS-ESI (*m/z*) [M+H]<sup>+</sup> расщ. для C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S<sub>3</sub> H, 511,1256; найдено 511,1259; **10R** [α]<sub>D</sub><sup>19</sup> = +340,0 (*c* = 0,12 ацетон) (э.и. = 93 %).

**[0373]** **Экспрессия и очистка белка.** Экспрессию и очистку белка выполняли точно как описано нами.<sup>2</sup> Кратко, мы использовали вариант S74E-C4S-dCK, который представляет собой человеческий белок dCK, где 4 подвергаемых действию растворителя цистеины мутируют в серины (C4S). Мы показали, что C4S мутант создает кристаллы лучшего качества без изменения 3 мерной конформации фермента или его ферментативной активности.<sup>22</sup> Кроме того, фермент содержал мутацию Ser74 глутаминовой кислоты (S74E); эта мутация служит для имитации фосфорилированного состояния данного остатка. Когда мы говорим о dCK в данном сообщении, мы имеем в виду вариант C4S-S74E-dCK. dCK экспрессировали в клетках *Escherichia coli* BL21 C41(DE3), используя pET-14b вектор; клетки выращивали в среде 2xYT и индуцировали 0,1 mM IPTG в течение 4 ч при 310 K. Клетки собирали и пеллету лизировали ультразвуком. Лизат осветляли центрифугированием при 30 000 об./мин в течение 1 ч при 277 K и супернатант загружали в 5мл HisTrap никель-аффинную колонку (GE Healthcare). Колонку промывали 300 мл буфера, состоящего из 25 mM Трис–HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 30 mM имидазола. Связанный белок элюировали тем же самым буфером, но содержащим 250 mM имидазола и дополнительно чистили, используя гель-фильтрацию с использованием S-200 колонки в

буфере, состоящем из 25 мМ HEPES pH 7,5, 200 мМ натрия цитрата, 2 мМ ЭДТУ, 3 мМ DTT. Белковые фракции объединяли, концентрировали, делили на аликвоты, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при 193 К до использования.

**[0374] Кинетический анализ.** Активность фосфорилирования о dCK определяли, используя спектроскопический NADH-зависимый фермент-спаренный анализ.<sup>2, 23</sup> Все измерения были проведены в трех повторах при 310 К в буфере, состоящем из 100 мМ Трис pH 7,5, 200 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ ЭДТУ, 0,8 мМ фосфоенолпирувата, 0,4 мМ NADH с 50 нМ dCK и 1 мМ АТФ. IC<sub>50</sub><sup>app</sup> и Ki<sup>app</sup> определяли, как описано нами<sup>9</sup> и все данные были установлены с помощью программного обеспечения KaleidaGraph.

**[0375] IC<sub>50</sub> определения.** Выполняли на CCRF-CEM клетках острого лимфобластного лейкоза как описано ранее.<sup>8, 9</sup>

**[0376] Исследования РЕТ.** Исследования РЕТ, чтобы определить % ингибирования активности dCK *in vivo* выполняли, как описано ранее.<sup>8, 9</sup>

**[0377] Анализы по человеческой микросомальной стабильности.** Данные анализы выполняли с помощью Cyprotex (Watertown, MA) в соответствии со стандартными операционными протоколами.

**[0378] Фармакокинетика в плазме соединений 8 и 10 у мышей.** Данные измерения выполняли, как описано ранее.<sup>8, 9</sup> Кратко, C57Bl/6 самок мышей обрабатывали ингибиторами dCK путем внутрибрюшинной инъекции. Лекарственные средства вводили в 50 % полиэтиленгликоле (ПЭГ 400)/50 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Через пять минут после инъекции лекарственного средства, цельную кровь (~75 мкл) получали в разные точки времени из ретро-орбитального синуса, используя гематокрит капиллярные пробирки. Образцы центрифугировали на 20 000 x g в течение 5 мин, и супернатант (5 мкл) переносили в чистую пробирку. Калибровочные стандарты получали методом добавок разных количеств **9** и **10** в 5 мкл супернатанта из плазмы необработанных мышей, чтобы получить конечные концентрации от 0,001 до 100 пмоль/мкл. Образцы и калибровочные стандарты смешивали с 500 мкл охлажденной льдом смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.), содержащей внутренний стандарт (**1a**). Все образцы выпаривали досуха в вакуумной центрифуге. Остаток восстанавливали в 100 мкл ацетонитрил/вода (50/50, об./об.). Образцы (5 мкл) впрыскивали в колонку с обращенной фазой (Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition Eclipse Plus C18, 2,1 x 50 мм, 1,8 мкм), уравновешенную в воде ацетонитрил/муравьиная кислота, 95/5/0,1 и элюировали (200 мкл/мин) с

увеличением концентрации растворителя В (ацетонитрил/муравьиная кислота 100/0,1, об./об.: мин/ % ацетонитрила; 0/5, 2/5, 8/80, 9/80, 10/5, 12/5). Поток, выходящий из колонны, направляли на источник электрораспыления ионов (Agilent Jet Stream), подключенный к тройному квадрупольному масс-спектрометру (Agilent 6460 QQQ), работающего в режиме положительных ионов MRM. Ионные переходы для **Ia**, **9** и **10** являются от 476,2 до 334,5, от 550,2 до 408,2, от 511,1 до 369,1 соответственно. Площади пиков для **9** и **10** нормализовали к площади пика внутреннего стандарта и концентрации в плазме вычисляли используя, стандартные кривые, построенные по калибровочным стандартам, полученным в плазме от необработанных мышей. Приблизительные значения площади под кривой (AUC), времени полувыведения ( $T_{1/2}$ ), максимальной концентрации в плазме ( $C_{max}$ ) и времени достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) рассчитывали, используя Boomer/Multi-Forte PK Функции из Microsoft Excel.<sup>24, 25</sup>

**[0379] Кристаллизация, сбор рентгеновских данных, и уточнения.** Кристаллы человеческого dCK в комплексе с ингибиторами и UDP выращивали при 285 К, используя способ паровой диффузии висячей капли. Все комплексы dCK–ингибитор получали следующим образом: 1 мкл dCK белка при 10–17 мг/мл в комплексе с 2,5-кратным молярным избытком ингибитора, 2 мМ UDP и 5 мМ MgCl<sub>2</sub> смешивали с 1 мкл запасного буферного раствора. Запасной раствор состоял из 0,9–1,5 М тринатрия цитрата дегидрата и 25 мМ HEPES pH 7,5. До начала сбора данных, кристаллы пропитывали в минеральном масле для криозащиты. Дифракционные данные для dCK в комплексе с соединениями 2-6 собирали на Life Sciences Collaborative Access Team (LS-CAT) канале синхротронного излучения 21-ID-G. Данные для всех других комплексов (соединений 7-10) собирали, используя внутренний рентгеновский источник (Rigaku RU-200, с вращающимся анодом) с R-Axis IV++ детектором пластины изображения. Данные обрабатывали и масштабировали с помощью XDS и XSCALE.<sup>26</sup> Структуры определяли путем молекулярного замещения с MOLREP<sup>27</sup>, используя структуру dCK (PDB точка входа 4JLN<sup>9</sup>) в качестве поисковой модели. Уточнения проводили, используя REFMAC<sup>28</sup>, и модель строили, используя Coot.<sup>29</sup> Все координаты ингибитора и описания библиотеки генерировали, используя PRODRG сервер.<sup>30</sup> Все наборы данных совершенно удваивались и итерационные уточнения проводили, используя REFMAC с двойными активными опциями. Сбор данных и статистика уточнений приведены в **Таблице 1**. Структурные фигуры получали, используя молекулярную графическую систему PyMOL (v,1,6,0; Schrödinger).

**[0380] Моделирование.** S-изомер в Положении-1 и R-изомер в Положении-2 генерировались перебрасыванием хиральности углерода линкера, используя Maestro v. 9,1, Schrödinger, LLC 2010. Данную программу также использовали для создания торсионных сканирований вокруг связи, связывающей хиральный углерод линкера и тиазольное кольцо (торсионный угол определяется CAC-CBC-CBB-NAO).

**[0381]** Моделирования уравнивания выполняли, используя MCPRO 2,0 пакет программного обеспечения<sup>31</sup> с OPLS-AA<sup>17</sup> силовым полем. Белок сольватирован в 30 Å крышка TIP4P молекул воды.<sup>16</sup> Скелет белка и все длины связи с белком были зафиксированы. Углы и деформации кручения в пределах 11 Å центра связанной молекулы могли варьировать. Испытывались все степени свободы связанной молекулы. Уравнивание начинали с  $5 \times 10^6$  конфигураций только движением растворителя, с последующими  $10 \times 10^6$  конфигурациями, в которых испытывались белок и связанная молекула, с с дополнительным отбором растворителем в каждой десятой конфигурации. Уравнивания выполняли, используя Metropolis Monte Carlo в NPT совокупности при 1 атм. и 25 °С. Для несвязанных структур, оптимизации выполняли, используя OPLS-AA. Неявно определенный растворитель смоделировали, используя обобщенный способ Борна/площади поверхности (GB/SA).<sup>19, 21</sup> Энергии оценивали, используя PDDG/PM3 способ<sup>32</sup> в пакете BOSS программного обеспечения.<sup>31</sup>

### **[0382] PDB ID КОДЫ**

Комплекс	2	3	4	5	6	7	8	10R
PDB коды	4Q18	4Q19	4Q1A	4Q1B	4Q1C	4Q1D	4Q1E	4Q1F

### **[0383] Спектры для соединений 1, 2, 7, 8, 9R, 9S и 10S**

**[0384] 1-(5-(4-(((4-аминопиримидин-2-ил)тио)метил)-5-пропилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)-2-метилпропан-2-ол (1 = DI-48).** <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, Ацетон-d<sub>6</sub>) δ 7,99 (д, J = 6,0 Гц, 1H), 7,53 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,45 (дд, J = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,03 (д, J = 8,5 Гц, 1H), 6,31 (ш с, 2H), 6,28 (д, J = 5,5 Гц, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,88 (с, 2H), 2,93 (т, J = 7,5 Гц, 2H), 1,73 – 1,64 (м, 2H), 1,32 (с, 6H), 0,99 (т, J = 7,0 Гц, 3H); <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, Ацетон-d<sub>6</sub>) δ 170,4, 163,8, 163,5, 155,3, 151,5, 149,3, 148,4, 134,7, 126,9, 119,4, 112,2, 111,3, 101,0, 77,7, 69,2, 55,5, 28,3, 28,1, 26,0 (2), 25,2, 13,1; HRMS-ESI (m/z) [M + H]<sup>+</sup> рассч. для C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> H, 461,1681; найдено 461,1667.

**[0385] 1-(5-(4-(((2,6-диаминопиримидин-4-ил)тио)метил)-5-пропилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)-2-метилпропан-2-ол (2 = DI-49)**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,40 – 7,35 (м, 2H), 7,04 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 6,21 (с, 2H), 5,99 (с, 2H), 5,67 (с, 1H), 4,60 (с, 1H), 4,39 (с, 2H), 3,82 (с, 3H), 3,76 (с, 2H), 2,83 (т,  $J = 7,5$  Гц, 2H), 1,60 – 1,52 (м, 2H), 1,22 (с, 6H), 0,92 (т,  $J = 7,0$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  163,8, 163,4, 162,4, 150,8, 148,7, 148,1, 134,8, 126,0, 119,2, 112,4, 110,3, 90,2, 77,0, 68,8, 55,9, 54,9, 27,7, 26,7 (2), 26,1, 24,9, 13,5; HRMS-ESI ( $m/z$ )  $[\text{M} + \text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$  H, 476,1790; найдено 476,1798.

**[0386] 2-(((1-(2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-пропилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин (7 = DI-68).**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,55 (д,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 7,44 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1H), 6,88 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 5,25 (с, 1H), 5,24 (кв,  $J = 7,0$  Гц, 1H), 4,87 (дд,  $J = 5,6, 2,8$  Гц, 1H), 4,77 (дд,  $J = 5,6, 2,8$  Гц, 1H), 4,55 (с, 4H), 4,47 (дд,  $J = 5,0, 3,5$  Гц, 1H), 4,34 (дд,  $J = 5,0, 3,5$  Гц, 1H), 3,90 (с, 3H), 2,98 – 2,79 (м, 2H), 1,81 (д,  $J = 7,0$  Гц, 3H), 1,75 – 1,58 (м, 2H), 1,00 (т,  $J = 7,0$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,8, 163,8, 163,2 (2), 153,0, 150,9, 148,0, 133,0, 127,4, 120,3, 111,7, 111,6, 81,9 (д,  $J_{\text{CF}} = 170,6$  Гц), 80,6, 68,4 (д,  $J_{\text{CF}} = 20,6$  Гц), 56,1, 37,8, 28,5, 25,3, 22,4, 13,9; HRMS-ESI ( $m/z$ )  $[\text{M} + \text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}_2$  H, 464,1590; найдено 464,1567.

**[0387] 2-(((1-(2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин (8 = DI-72).**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7,53 (с, 1H), 7,43 (д,  $J = 8,4$  Гц, 1H), 7,02 (д,  $J = 8,4$  Гц, 1H), 5,34 – 5,30 (м, 2H), 4,82 – 4,80 (м, 1H), 4,72 – 4,70 (м, 1H), 4,35 – 4,34 (м, 1H), 4,30 – 4,28 (м, 1H), 2,52 (с, 3H), 1,75 (д,  $J = 7,0$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  170,4, 165,8, 165,2, 154,8, 152,7, 149,7, 128,6, 128,1, 121,5, 113,3, 112,8, 83,8, 82,5, 80,6, 70,1, 70,0, 56,5, 38,4, 22,20, 11,5; HRMS-ESI ( $m/z$ )  $[\text{M} + \text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}_2$  H, 436,1277; найдено 436,1270.

**[0388] (R)-2-(((1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин (9R = R-DI-75).**  $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +265,7$  ( $c = 0,22$  ацетон) (э.и. = 99 %).

**[0389] (S)-2-(((1-(2-(3-Этокси-4-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-метилтиазол-4-ил)этил)тио)пиримидин-4,6-диамин (9S = S-DI-75).**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -228,6$  ( $c = 0,14$  ацетон) (э.и. = 99 %).

**[0390] (S)-N-(2-(5-(4-(1-(((4,6-диаминопиримидин-2-ил)тио)этил)-5-метилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)этил)метан-сульфонамид (10S = S-DI-82).**  $[\alpha]_{\text{D}}^{19} = -536,4$  ( $c = 0,11$  ацетон) (э.и. = 99 %).

**[0391]** Список литературы для примера 1:

1. Eriksson, S.; Munch-Petersen, B.; Johansson, K.; Eklund, H. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59, 1327-46.
2. Sabini, E.; Ort, S.; Monnerjahn, C.; Konrad, M.; Lavie, A. Structure of human dCK suggests strategies to improve anticancer and antiviral therapy. *Nat Struct Biol* 2003, 10, 513-9.
3. Toy, G.; Austin, W. R.; Liao, H. I.; Cheng, D.; Singh, A.; Campbell, D. O.; Ishikawa, T. O.; Lehmann, L. W.; Satyamurthy, N.; Phelps, M. E.; Herschman, H. R.; Czernin, J.; Witte, O. N.; Radu, C. G. Requirement for deoxycytidine kinase in T and B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107, 5551-6.
4. Austin, W. R.; Armijo, A. L.; Campbell, D. O.; Singh, A. S.; Hsieh, T.; Nathanson, D.; Herschman, H. R.; Phelps, M. E.; Witte, O. N.; Czernin, J.; Radu, C. G. Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *J Exp Med* 2012, 209, 2215-28.
5. Choi, O.; Heathcote, D. A.; Ho, K. K.; Muller, P. J.; Ghani, H.; Lam, E. W.; Ashton-Rickardt, P. G.; Rutschmann, S. A deficiency in nucleoside salvage impairs murine lymphocyte development, homeostasis, and survival. *J Immunol* 2012, 188, 3920-7.
6. Yang, C.; Lee, M.; Hao, J.; Cui, X.; Guo, X.; Smal, C.; Bontemps, F.; Ma, S.; Liu, X.; Engler, D.; Parker, W. B.; Xu, B. Deoxycytidine kinase regulates the G2/M checkpoint through interaction with cyclin-dependent kinase 1 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* 2012, 40, 9621-32.
7. Nathanson, D. A.; Armijo, A. L.; Tom, M.; Li, Z.; Dimitrova, E.; Austin, W. R.; Nomme, J.; Campbell, D. O.; Ta, L.; Le, T. M.; Lee, J. T.; Darvish, R.; Gordin, A.; Wei, L.; Liao, H. I.; Wilks, M.; Martin, C.; Sadeghi, S.; Murphy, J. M.; Boulos, N.; Phelps, M. E.; Faull, K. F.; Herschman, H. R.; Jung, M. E.; Czernin, J.; Lavie, A.; Radu, C. G. Co-targeting of convergent nucleotide biosynthetic pathways for leukemia eradication. *J Exp Med* 2014, 211, 473-86.
8. Murphy, J. M.; Armijo, A. L.; Nomme, J.; Lee, C. H.; Smith, Q. A.; Li, Z.; Campbell, D. O.; Liao, H. I.; Nathanson, D. A.; Austin, W. R.; Lee, J. T.; Darvish, R.; Wei, L.; Wang, J.; Su, Y.; Damoiseaux, R.; Sadeghi, S.; Phelps, M. E.; Herschman, H. R.; Czernin, J.; Alexandrova, A. N.; Jung, M. E.; Lavie, A.; Radu, C. G. Development of new deoxycytidine kinase inhibitors

and noninvasive in vivo evaluation using positron emission tomography. *J Med Chem* 2013, 56, 6696-708.

9. Nomme, J.; Murphy, J. M.; Su, Y.; Sansone, N. D.; Armijo, A. L.; Olson, S. T.; Radu, C.; Lavie, A. Structural characterization of new deoxycytidine kinase inhibitors rationalizes the affinity-determining moieties of the molecules. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2014, 70, 68-78.

10. Godsey, M. H.; Ort, S.; Sabini, E.; Konrad, M.; Lavie, A. Structural basis for the preference of UTP over ATP in human deoxycytidine kinase: illuminating the role of main-chain reorganization. *Biochemistry* 2006, 45, 452-61.

11. Sabini, E.; Hazra, S.; Ort, S.; Konrad, M.; Lavie, A. Structural basis for substrate promiscuity of dCK. *J Mol Biol* 2008, 378, 607-21.

12. Shu, Y. Z.; Johnson, B. M.; Yang, T. J. Role of biotransformation studies in minimizing metabolism-related liabilities in drug discovery. *AAPS J* 2008, 10, 178-92.

13. Mikhailovskii, D. I.; Mikhailovskaya, V. N. Rearrangement of Acetylenic Keto Alcohols under Meyer-Schuster Reaction Conditions. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Khim.Khim.T* 1987, 30, 29-31.

14. Gudipati, V.; Curran, D. P.; Wilcox, C. S. Solution-phase parallel synthesis with oligoethylene glycol sorting tags. Preparation of all four stereoisomers of the hydroxybutenolide fragment of murisolin and related acetogenins. *J Org Chem* 2006, 71, 3599-607.

15. Corey, E. J.; Bakshi, R. K.; Shibate, S. Highly enantioselective borane reduction of ketones catalyzed by chiral oxazaborolidines. Mechanism and synthetic implications. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 5551-5553.

16. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *Journal of Chemical Physics* 1983, 79, 926-935.

17. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; TiradoRives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society* 1996, 118, 11225-11236.

18. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. Molecular modeling of organic and biomolecular systems using BOSS and MCPRO. *Journal of Computational Chemistry* 2005, 26, 1689-1700.

19. Jorgensen, W. L.; Ulmschneider, J. P.; Tirado-Rives, J. Free energies of hydration from a generalized Born model and an ALL-atom force field. *Journal of Physical Chemistry B* 2004, 108, 16264-16270.
20. Repasky, M. P.; Chandrasekhar, J.; Jorgensen, W. L. PDDG/PM3 and PDDG/MNDO: improved semiempirical methods. *J Comput Chem* 2002, 23, 1601-22.
21. Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *Journal of the American Chemical Society* 1990, 112, 6127-6129.
22. Sabini, E.; Hazra, S.; Konrad, M.; Lavie, A. Nonenantioselectivity property of human deoxycytidine kinase explained by structures of the enzyme in complex with L- and D-nucleosides. *J Med Chem* 2007, 50, 3004-14.
23. Agarwal, K. C.; Miech, R. P.; Parks, R. E., Jr. Guanylate kinases from human erythrocytes, hog brain, and rat liver. *Methods Enzymol* 1978, 51, 483-90.
24. Bourne, D. W. MULTI-FORTE, a microcomputer program for modelling and simulation of pharmacokinetic data. *Comput Methods Programs Biomed* 1986, 23, 277-81.
25. Bourne, D. W. BOOMER, a simulation and modeling program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis. *Comput Methods Programs Biomed* 1989, 29, 191-5.
26. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, 66, 125-32.
27. Vagin, A.; Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, 66, 22-5.
28. Murshudov, G. N.; Skubak, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011, 67, 355-67.
29. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, 66, 486-501.
30. Schuttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004, 60, 1355-63.

31. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. Molecular modeling of organic and biomolecular systems using BOSS and MCPRO. *J Comput Chem* 2005, 26, 1689-700.
32. Repasky, M. P.; Chandrasekhar, J.; Jorgensen, W. L. Improved semiempirical heats of formation through the use of bond and group equivalents. *J Comput Chem* 2002, 23, 498-510.

## 2. Пример 2

**[0392]** Возможность перепрограммирования клеточного метаболизма, отличительный признак рака впервые, давно отмеченный (Warburg et al., 1927) и недавно вновь оцененный, имеет важное значение для прогрессирования опухоли (Hanahan and Weinberg, 2011). В то время как, инициированные раком метаболические перепрограммируемые процессы являются перспективными терапевтическими мишенями (Vander Heiden, 2011), существование альтернативы, компенсаторные биосинтетические пути представляет значительную трудность для развития таких терапий. Например, в липидном метаболизме, раковые клетки извлекают внеклеточные липиды как альтернативу к энергопотребляющему *de novo* биосинтезу жирных кислот (Kamphorst et al., 2011). В аминокислотном метаболизме, глицин и серин, требуемые для роста опухоли, могут быть получены *de novo* и также могут извлекаться из внеклеточной среды (Jain et al., 2012; Maddocks et al., 2012).

**[0393]** Нуклеотидный метаболизм также включает избыточные и конвергентные пути биосинтеза. Дезоксирибонуклеотидтрифосфатные (dNTP) пулы, необходимые для репликации и репарации ДНК могут быть получены за счет *de novo* пути (DNP) или за счет пути реутилизации нуклеозида (NSP) (**Фиг. 16А**) (Reichard, 1988). DNP использует глюкозу и аминокислоты для создания рибонуклеотиддисфосфатов (NDP), которые превращаются в дезоксирибонуклеотиддифосфаты (dNDP) с помощью рибонуклеотидредуктазы (RNR). Такие же dNDP также могут быть получены с помощью NSP (Reichard, 1988), начиная с внеклеточных дезоксирибонуклеозидов (dN), которые попадают в клетки через специализированные транспортеры. Первые ферментные стадии в цитозольном NSP катализируется двумя киназами: тимидинкиназа 1 (TK1) фосфорилирует тимидин (dT), тогда как дезоксицитидинкиназа (dCK) фосфорилирует дезоксицитидин (dC), дезоксиаденозин (dA) и дезоксигуанозин (dG) (Reichard, 1988). Востребованность данных двух NSP киназ для продуцирования dNTP в нормальных и злокачественных клетках еще предстоит определить. Поскольку dN субстраты для NSP

киназ отсутствуют у большинства клеточных культуральных сред, то предполагается, что NSP является необязательной для репликации ДНК (Xu et al., 1995). Однако, недавно *in vivo* полученные результаты подвергли сомнению это предположение. Например, мы сообщали о нарушенном клеточном делении у *dCK<sup>-/-</sup>* мышей, из-за дефицита дЦТФ пула, что в результате приводит к стрессу репликации (RS), S-фазовой блокировке и повреждению ДНК в гематопозитических клетках-предшественниках (Austin et al., 2012; Toy et al., 2010). Анализы *dCK/TK1* дважды нокаутных мышей показал, что NSP-производные синтеза дЦТФ требуется для компенсации ингибирования *de novo* продуцирования дЦТФ (Austin et al., 2012) (Фиг. 16А). Механизм ингибирования DNP включает аллостерическое регулирование RNR-опосредованного восстановления цитидиндифосфата (CDP) до дезоксицитидиндифосфата (dCDP) за счет dTTP, продуцированного через TK1 из эндогенного dT (Austin et al., 2012) (Фиг. 16А).

**[0394]** Продуцирование dNTP за счет NSP может быть терапевтически относящимся к раку. Например, способность раковых клеток переключать свой синтез дЦТФ с DNP на NSP может объяснить, почему dT, преподносимый как дЦТФ-перебрасывающий агент показал, ограниченную эффективность в клинических испытаниях (Chiuten et al., 1980; Kufe et al., 1980; Kufe et al., 1981). Если все правильно, и не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, эта гипотеза предполагает, что комбинация dT (для ингибирования DNP, опосредованного продуцирования дЦТФ) вместе с ингибитором dCK (для совместного продуцирования дЦТФ за счет NSP), будет более эффективной в уничтожении опухолевых клеток, чем только одно лечение самостоятельно. Здесь мы исследуем данную возможность в контексте острого лимфобластного лейкоза (ALL). Мы демонстрируем, что совместно направленное взаимодействие как *de novo*, так и путей реутилизации для биосинтеза дЦТФ хорошо переносятся у мышей, и является эффективным в T-ALL и B-ALL моделях. Мы также описываем анализ на основе позитронно-эмиссионной томографии (PET) касательно неинвазивного контроля *in vivo* фармакологически нацеленного биосинтеза дЦТФ в раковых клетках.

**[0395]** Реутилизация дезоксицитидина *через* dCK предотвращает dT-индуцированный летальный репликационный стресс в T-ALL клетках. Лечение dT повышает концентрацию цитозольного dTTP, что в результате приводит к аллостерическому ингибированию продуцирования дЦТФ за счет DNP (Фиг. 16А) (Reichard, 1988). Соответственно, в CCRF-CEM (CEM) человеческих T-ALL клетках, dT увеличил dTTP и снижал дЦТФ в дозозависимом способе (Фиг. 16В). В начале S-блокировка (Фиг. 16С) индуцировалась

концентрациями dT всего лишь 50 мкМ, что увеличивало dTTP ~20-раз и снижало дЦТФ ~5-раз (Фиг. 16B). Обогащение СЕМ культур 2,5 мкМ dC полностью предотвращает блокировку dT-индуцированной S-фазы (Фиг. 16C). Добавление dC не предотвратило блокировку S-фазы в СЕМ клетках, обработанных ингибитором RNR гидроксимочевинной, 5-фторурацилом (5-ФУ) или цисплатином (Фиг. 16D), указывая, что реутилизация dC играет определенную роль в противодействии блокированию dT-индуцированной S-фазы.

**[0396]** Для изучения роли dCK в предупреждении dT-индуцированной блокировки S-фазы добавлением dC, мы получили СЕМ dCK<sup>low</sup> клетки (Фиг. 16E), используя dCK-нацеленный кшРНК вектор. Понижение dCK уменьшало захват <sup>3</sup>H-дезокситидина на ~95 % (Фиг. 16F) и снижало цитозольные уровни дЦТФ на ~30 % (Фиг. 16G), но не нарушало нормальное развитие клеточного цикла (Фиг. 16H). Дополнение клеточных культуральных сред 2,5 мкМ dC восстанавливало дЦТФ пул в dT-обработанных dCK<sup>wt</sup> клетках до ~55 % от их исходного значения, но не имел никакого эффекта на dT-индуцированное истощение дЦТФ пула в dCK<sup>low</sup> клетках (Фиг. 16G). Следовательно, добавление dC предотвращало dT-индуцированную блокировку S-фазы только в СЕМ dCK<sup>wt</sup> клетках (Фиг. 16C), но не в СЕМ dCK<sup>low</sup> клетках (Фиг. 16H). Соответственно, в присутствии как dT, так и dC, только dCK<sup>low</sup>, но не dCK<sup>wt</sup> СЕМ клетки показывали (i) активацию RS ответного маркера Chk1, фосфорилированного по Ser345 (pChk1) (Фиг. 16I), (ii) индуцирование повреждения ДНК, как определено путем активация Chk2, фосфорилированного по Thr68 (pChk2) (Фиг. 16I), pH2A.X окрашивание с помощью проточной цитометрии (Фиг. 16J), а также кометным анализом (Фиг. 16K) и (iii) апоптоз (Фиг. 16L). Таким образом, понижающая регуляция экспрессии dCK в СЕМ клетках аннулировала способность компенсировать dT-опосредованное ингибирование продуцирования дЦТФ за счет DNP, что в результате привело к истощению дЦТФ, заторможенной репликации ДНК, RS, повреждению ДНК и апоптозу.

**[0397]** В T-ALL клетках dT запускает метаболический переключатель на NSP продуцирование дЦТФ и повышающе регулирует dC реутилизацию. Для того, чтобы исследовать биохимический механизм, по которому NSP компенсирует dT-опосредованное DNP ингибирование, мы количественно определили вклад каждого дЦТФ пути биосинтеза в как свободную цитозольную дЦТФ, так и дЦТФ, введенную в ДНК. СЕМ клетки инкубировали в течение 12 ч с [U-<sup>13</sup>C]-глюкозой, субстратом для DNP, и с [U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-dC, субстратом для NSP (Фиг. 17A). Тяжелый изотоп, которым метили виды дЦТФ детектировали, используя комбинированную жидкостную хроматографию-

тандемную масс-спектрометрию в режиме мониторинга нескольких реакций (ЖХ/МС/МС-МРМ). Массовые дополнения между 3 и 8 идентифицировали дЦТФ, полученную из [U-<sup>13</sup>C]-глюкозы за счет DNP, тогда как массовые дополнения между 11 и 12 идентифицировали дЦТФ, полученную из [U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-dC за счет NSP (Фиг. 17А).

**[0398]** В необработанных СЕМ клетках, свободный дЦТФ пул, полученный из dC за счет NSP в течение 12 ч периода введения метки, был в ~5-раз больше, чем свободный дЦТФ пул, происходящих из глюкозы за счет DNP (Фиг. 17В). Однако, в ~2,5 раза больше дЦТФ, введенного в ДНК, продуцировалось DNP, чем NSP (Фиг. 17В). Обработка dT снижала дЦТФ продуцирование из глюкозы за счет DNP, как в свободных цитозольных, так и ДНК дЦТФ пулах (Фиг. 17В). Более того, dT увеличивал использование NSP-полученного дЦТФ для синтеза ДНК больше, чем в 3-раза по сравнению с исходными значениями (Фиг. 17В). Данные полученные результаты подтверждают предыдущие наблюдения, что, в базисных условиях, синтез ДНК главным образом обуславливается DNP-продуцированной дЦТФ (Xu et al., 1995). Соответственно, большой размер NSP-полученного свободного дЦТФ пула в необработанных СЕМ клетках (Фиг. 17В) вероятно, отражает его неэффективное использования для репликации ДНК в базисных условиях. Примечательно, NSP-полученный свободный дЦТФ пул не уменьшался в dT обработанных клетках, даже при том, что использование этого пула для синтеза ДНК значительно увеличилось (Фиг. 17В). Эта находка позволяет предположить, что dT повышающе регулирует дЦТФ продуцирование за счет NSP, что согласуется с заметным увеличением активности dСК (Фиг. 17С) и захватом dC (Фиг. 17D) в dT-обработанных СЕМ клетках.

**[0399]** In vivo, реутилизация эндогенного dC деблокируют T-ALL клетки из RS индуцированных dT обработкой. Для того, чтобы проверить могут ли полученные результаты от исследований культур клеток (Фиг. 16; Фиг. 17) быть воспроизведены in vivo, подкожные (п.к.) СЕМ dСК<sup>wt</sup> и dСК<sup>low</sup> ксенотрансплантаты были установлены NOD SCID гамма (NSG) мышам. dT плазмы достиг максимума ~1,5 мМ через два часа после обработки одной dT инъекцией (2 г/кг, внутривенно) и затем быстро снизился до исходных значений (~10 мкМ) через 8 ч (Фиг. 18А). Внутриопухольный dТТР увеличивался как в dСК<sup>wt</sup>, так и dСК<sup>low</sup> опухолях в течение, по меньшей мере, 4 ч после dT введения (Фиг. 18А). В dСК<sup>wt</sup> опухолях, dT индуцировал небольшую и кратковременную повышающую регуляцию pChk1 в точках времени через 2 и 4 ч (Фиг. 18В). В противоположность этому, более выраженная и устойчивая повышающая

регуляция pChk1 была индуцирована обработкой dT в dCK<sup>low</sup> опухолях (Фиг. 18B). Эти полученные результаты позволяют предположить, что dCK требуется для того, чтобы СЕМ клетки были способны противостоять RS, индуцированному обработкой dT *in vivo*.

**[0400]** Для того, чтобы понять роль dCK в продуцировании и использовании дЦТФ в опухолях от dT обработанных мышей, мы измеряли свободный дЦТФ пул и инкорпорирование NSP-продуцированного дЦТФ в ДНК. В течение 0-4 ч периода времени, дЦТФ уменьшился в несколько раз как в СЕМ dCK<sup>wt</sup>, так и в dCK<sup>low</sup> ксенотрансплантатах и затем начал восстанавливаться так как dT плазмы упал до исходных значений (Фиг. 18C). Восстановление внутриопухолевого дЦТФ происходило значительно медленнее в dCK<sup>low</sup> ксенотрансплантатах, чем в их двойниках дикого типа (Фиг. 18C). Для количественной оценки влияния обработки dT на использовании NSP-продуцированного дЦТФ для синтеза ДНК, несущих опухоль мышей обрабатывали dT или носителем в течение 3,5 ч и затем возбуждали импульс [U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-меченным dC. Через тридцать минут мышей умерщвляли для измерения инкорпорирования дЦТФ, полученного из меченого dC в опухолевой ДНК с помощью ЖХ/МС/МС-МРМ (Фиг. 18D). В опухолях от обработанных носителем мышей в ~2-раза меньше дЦТФ, полученного из [U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-меченого dC, было инкорпорировано в ДНК dCK<sup>low</sup> опухолей, чем в ДНК их dCK<sup>wt</sup> двойников (Фиг. 18E). В dT обработанных мышях, меченное дЦТФ инкорпорирование в ДНК увеличилось в ~3-раза в dCK<sup>wt</sup> опухолях, но остался неизменным в dCK<sup>low</sup> ксенотрансплантатах (Фиг. 18E). Вместе с характером pChk1 повышающей регуляции, показанным на Фиг. 18B, эти полученные результаты свидетельствуют о том, что при обработке dT *in vivo* активность dCK требуется для поддержания репликации ДНК опухоли, тем самым предотвращая RS индукцию. Кроме того, аналогичные полученным результатам *in vitro* (Фиг. 17B) обработка dT *in vivo* увеличивает инкорпорирование NSP-продуцированного дЦТФ в ДНК опухоли.

**[0401]** Для того, чтобы определить, является ли увеличение в использовании NSP-продуцированного дЦТФ для синтеза ДНК в опухолях от dT обработанных мыши также связанном с повышающей регуляцией NSP как показано *in vitro* (Фиг. 17, C и D), мы воспользовались преимуществом <sup>18</sup>F-L-FAC (1-L-(2'-дезоксидеокси-2',-<sup>18</sup>фторарабинофуранозил)цитозин), фторированный dC аналог (Radu et al., 2008; Shu et al., 2010). <sup>18</sup>F-L-FAC проходит клеточную мембрану с помощью нуклеозидных транспортеров и накапливается именно в dCK экспрессирующих клетках по фосфорилирование-зависимому механизму (Фиг. 18F); dCK-зависимое фосфорилированное <sup>18</sup>F-L-FAC

удержание у живых животных может быть визуализировано и количественно определено неинвазивно с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET). Как и ожидалось, dCK<sup>low</sup> опухоли накапливали на ~40 % меньше <sup>18</sup>F-L-FAC, чем dCK<sup>wt</sup> опухоли (Фиг. 18F). Через четыре часа после обработки dT, накопление <sup>18</sup>F-L-FAC повышалось на ~20 % в dCK<sup>wt</sup> опухолях (Фиг. 18G). Накопление <sup>18</sup>F-L-FAC также повышалось в dCK<sup>low</sup> опухолях (Фиг. 18G), вероятно, из-за их остаточной dCK активности. Однако, повышающая регуляция NSP в dCK<sup>low</sup> опухолях была недостаточной для поддержания синтеза ДНК и предотвращения индукции RS, как показано как маркированной, так и устойчивой pChk1 повышающей регуляцией в dCK<sup>low</sup> опухолях от dT обработанных мышей (Фиг. 18B) и низким инкорпорированием в dCK<sup>low</sup> опухолях меченого стабильным изотопом дЦТФ в ДНК (Фиг. 18E).

**[0402]** NSP опосредует T-ALL клеточную резистентность к обработке dT *in vivo*. Поскольку NSP требуется для предотвращения dT-индуцированного RS в T-ALL клетках в культуре (Фиг. 16I) и *in vivo* (Фиг. 18C), мы определили является ли понижающая регуляция экспрессии dCK синергетичной с обработкой dT, чтобы индуцировать регрессию опухоли у мышей. СЕМ dCK<sup>wt</sup> и dCK<sup>low</sup> п.к. несущих опухоль мышей обрабатывали dT (2 г/кг) дважды в день в течение 6 дней. Продолжительное dT введение блокировало рост опухолей СЕМ dCK<sup>low</sup> без влияния на dCK<sup>wt</sup> ксенотрансплантаты, как показано (i) серийными измерениями секретированной *Gaussia* люциферазы, которая служила как показатель опухолевой массы в периферической крови (Tannous, 2009) (Фиг. 19A) и (ii) измерения конечной точки размеров опухоли (Фиг. 19B) и массы (Фиг. 19C). Синергизм между обработкой dT и кшРНК-опосредованной dCK понижающей регуляцией предполагает, что фармакологическое dCK ингибирование, в сочетании с введением dT, может обеспечить новую терапевтическую стратегию в ALL.

**[0403]** Разработка DI-39, малой молекулы, ингибитора dCK с высокой аффинностью, которая занимает сайт связывания субстрата киназы. Для того, чтобы изучить может ли NSP использоваться терапевтически через фармакологическое dCK ингибирование, мы провели скрининг селективных химических библиотек, включающих ~90 000 малых молекул. Данный скрининг с высокой пропускной способностью (HTS) идентифицировал DI-0120 (Фиг. 20A), ингибитор dCK с IC<sub>50</sub> 1,4 мкМ в СЕМ клетках. Последующее исследование взаимосвязи структура-активность (SAR) дали DI-39 (Фиг. 20B), проникающий в клетку (Фиг. 20C) ведущий кандидат с IC<sub>50</sub> 5 нМ, почти в 300 раз более низкий, чем тот, что для DI-0120 (Фиг. 20D и (Murphy et al., 2013)). Для того, чтобы

исследовать, как DI-39 ингибирует dCK мы получили 2,1 Å сокристаллическую структуру, которая показала, что DI-39 занимает нуклеозид-связывающий сайт киназы, а не сайт связывания донора фосфорил нуклеотида (Фиг. 20Е; Таблица 4). Этот способ связывания дает основание предполагать, что DI-39 является высоко специфическим ингибитором dCK.

**[0404]** Для дальнейшей оценки DI-39, мы измеряли его эффекты на дЦТФ пул СЕМ клеток. В то время, как обработка или DI-39 (1 мкМ), или dТ (50 мкМ) понижала дЦТФ на ~30 %, комбинация DI-39/dТ был синергетической, уменьшая дЦТФ в СЕМ клетках на ~70 % (Фиг. 20F). В то время, как в присутствии dС ни dТ, ни DI-39 сам по себе индуцированный RS или апоптоз в СЕМ клетках, комбинация DI-39/dТ инициировала оба RS, как измерено с помощью pChk1 повышающей регуляции (Фиг. 20G) и апоптозом, как измерено с помощью окрашивания аннексином V (Фиг. 20H). Следует отметить, что, когда dCK- нулевая лейкозная клеточная линия L1210-10K (Jordheim et al., 2004) была обработана возрастающими концентрациями DI-39 намного выше тех, которые необходимы для ингибирования активности dCK или уничтожения СЕМ клеток в сочетании с dТ, она не индуцировала апоптоз, дополнительно поддерживая селективность DI-39 для dCK (Фиг. 20I). Комбинация DI-39/dТ также индуцировала RS (Фиг. 20J) и апоптоз (Фиг. 20K) в четырех других клеточных линиях ALL (Jurkat, MOLT-4, RS4;11, NALM-6), а также в эритролейкозной клеточной линии (TF-1). Таким образом, DI-39 проникает в клетки, ингибирует NSP-зависимое дЦТФ продуцирование, и синергизирует с dТ, чтобы индуцировать летальные RS в нескольких лейкозных клеточных линиях.

**[0405]** DI-39 ингибирует активность опухоли dCK *in vivo* и способствует RS в сочетании с dТ. Для оценки DI-39 *in vivo*, мы определили его фармакокинетику (PK) в плазме и в опухолевых тканях. Время полувыведения с плазмы DI-39 составляло ~50 мин (Фиг. 21A), и обнаруживаемые количества лекарственного средства (~15 нМ) присутствовали в опухолевых тканях через 8 ч после введение одной дозы (Фиг. 21B). Для того, чтобы соотнести количество DI-39 в плазме и опухоли через 2, 4, 8 и 12 ч после введения лекарственного средства с фармакодинамическим (PD) эффектом DI-39 (т.е. ингибирование активности опухоли dCK), мы провели <sup>18</sup>F-FAC PET/CT сканирования несущих СЕМ опухоли мышей в данных точках времени (Фиг. 21C). DI-39 (50 мг/кг, введенные внутривенно) снижали накопление <sup>18</sup>F-FAC в опухолях на ~30 % в течение вплоть до 8 ч (Фиг. 21D). Этот уровень снижения сравнивали с тем, что получен в dCK нокдаун модели (Фиг. 18E). Время восстановления активности опухоли dCK,

определяли с ПЕТ, после введения DI-39, указывает на то, что устойчивое целевое ингибирование может быть получено путем введения DI-39 каждые 12 часов. Следует отметить, что эта информация не может быть получена из обычных измерений РК в плазме (**Фиг. 21А**).

**[0406]** Для дальнейшего исследования эффектов DI-39 на метаболизм опухоли дЦТФ, через 5,5 ч после обработки dT и/или DI-39, несущих СЕМ опухоль мышей возбуждали импульсами в течение 30 мин с  $[U-^{13}C/^{15}N]$ -dC. ЖХ/МС/МС-МРМ использовали для количественного определения инкорпорирования метки в ДНК. Аналогичные к нашим dСК нокдаун результатам (**Фиг. 18F**), DI-39 значительно снижал  $[U-^{13}C/^{15}N]$ -dC инкорпорирование в ДНК СЕМ клеток (**Фиг. 21E**). Кроме того, DI-39/dT комбинация способствовала RS в СЕМ опухолях, о чем свидетельствовало pChk1 повышающая регуляция (**Фиг. 21F**). В совокупности, данные полученные результаты показывают, что (i) DI-39 эффективно ингибирует активность опухоли dСК *in vivo* в течение вплоть до 12 ч, (ii) комбинация DI-39/dT индуцирует RS в СЕМ клетках *in vivo* и (iii), ПЕТ визуализация обеспечивает полезный PD дополнительный биомаркер для DI-39.

**[0407]** Фармакологическое совместно направленное взаимодействие DNP и биосинтез NSP дЦТФ с DI-39 и dT блокирует рост T-ALL ксенотрансплантатов у мышей. Терапевтическая эффективность комбинации DI-39/dT впервые была исследована у мышей, несущих установленные п.к. СЕМ ксенотрансплантаты. Только комбинированная терапия резко снижала нагрузку опухоли у данных мышей, как показано размерами (**Фиг. 22А**) и массами (**Фиг. 22В**) опухоли в конечной точке. Кроме того, окрашивание TUNEL собранных опухолей показало значительное индуцирование разрывов ДНК только комбинацией DI-39/dT (**Фиг. 22С**). В отличие от полученных результатов, показанных на **Фиг. 19**, обработка dT сама по себе имела маленький, но значительный эффект на размер и массу СЕМ опухолей (**Фиг. 22, А и В**). Эта разница, вероятно, объясняется небольшим увеличением dT РК с использованием препарата каптисол/ДМСО, использованного для совместное введение DI-39 с dT; DI-39 имеет ограниченную растворимость в водных солевых растворах. Терапевтическая эффективность комбинации DI-39/dT дополнительно подтверждалась в системной T-ALL модели, в котором СЕМ клетки впрыскивали внутривенно. В системной T-ALL модели, обработка dT сама по себе индуцировала ~7-кратное снижение в процентах лейкозных клеток в костном мозге (ВМ) по сравнению с носителем и DI-39 обработанных группах (**Фиг. 22D**). Эти данные свидетельствуют о том, что ВМ-резидентные лейкозные клетки являются более восприимчивыми к dT *in vivo*, чем

они находятся в клеточной культуре. Однако, комбинация DI-39/dT снижала тяжесть опухоли путем дополнительного 100-кратного по сравнению с dT самим по себе, показывая сильную синергию между двумя терапевтическими агентами (**Фиг. 22D**). Таким образом, фармакологическое совместное направленное взаимодействие как DNP, так и NSP дЦТФ биосинтетических путей является высокоэффективным против СЕМ лейкозных клеток *in vivo*.

**[0408]** Комбинированная терапия является эффективной против первичной В-ALL системной модели и имеет минимальное воздействие на нормальный гематопоетический пул клетки-предшественника. Далее мы оценивали эффективность комбинированной терапии DI-39/dT терапии против краткосрочных культур мышинных BCR-ABL (p185),  $Arf^{-/-}$  пре-В ALL клеток (p185<sup>BCR-ABL</sup>/ $Arf^{-/-}$ ) (Boulos et al., 2011; Williams et al., 2006). В то время как первичные В-ALL клетки были чувствительны в культуре к комбинации DI-39/dT, они требовали в 4-раза больше, чем dT чем СЕМ Т-ALL клеточная линия для оптимальной индукции апоптоза (**Фиг. 23А**). Этот вывод согласуется с предыдущими клиническими наблюдениями, что В-ALL является менее чувствительными к обработке dT, чем Т-ALL (Kufe et al., 1980). Для того, чтобы оценить эффективность dT и/или DI-39 в *in vivo* В-ALL модели, люциферазы светлячка, меченные p185<sup>BCR-ABL</sup>/ $Arf^{-/-}$  клетки инокулировали внутривенно NSG мышам. Через одиннадцать дней после инокуляции, визуализация биолюминесценции (BLI) люциферазы светлячка-меченной p185<sup>BCR-ABL</sup>/ $Arf^{-/-}$  ALL-несущих NSG мышей, обработанных носителем или DI-39 (50 мг/кг) показывали существенное системное заболевание с фокальным ВМ и локализацией селезенки (**Фиг. 23В**). В то время как обработка dT (2 г/кг) значительно снижала BLI сигналы в ВМ и селезенка, добавление DI-39 имело более явно выраженный эффект, чем dT сам по себе (**Фиг. 23, В и С**). Для подтверждения полученные результаты BLI, мы также проанализировали тяжесть лейкоза в ВМ с помощью проточной цитометрии, используя CD19 (маркер В клетки, который у NSG мышей присутствует только в лейкозных клетках) (**Фиг. 23D**). Обработка dT индуцировала значительное снижение процентного содержания p185<sup>BCR-ABL</sup>/ $Arf^{-/-}$  ALL клеток по сравнению с обработанными носителем мышами (**Фиг. 23D**). Добавление DI-39 в результате приводило к дополнительному ~2-кратному снижению процентного содержания лейкозных клеток по сравнению с dT самим по себе (**Фиг. 23D**). Данные полученные результаты, используя первичные p185<sup>BCR-ABL</sup>/ $Arf^{-/-}$  клетки, показывают, что комбинация DI-39/dT является эффективной против агрессивной *in vivo* В-ALL модели.

**[0409]** Параллельно с анализом ВМ резидентные лейкозные клетки, мы также оценивали влияние комбинированной терапии на гематопозитический пул клетки-предшественника. Мы проанализировали Lineage<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup> (LSK) HSC популяцию, а также краткосрочные (ST), долгосрочные (LT) и полипотентные клетки клетки-предшественника (MPP) гематопозитической клетки-предшественника. За исключением незначительного снижения процентного содержания LSK при обработке dT (**Фиг. 23Е**), не было никаких существенных изменений между контрольными и обработанными группами (**Фиг. 23, Е и F; Фиг. 25, А и В**). Таким образом, комбинированная терапия преимущественно нацеливается на ВМ-резидентные лейкозные клетки, несмотря на умеренные нормальные гематопозитические клетки-предшественники. Кроме того, DI-39 сам по себе или в комбинации с dT, при введении дважды/день в течение 7 дней у NSG мышей, не влияли на массу тела (**Фиг. 23G**), и не имели никаких обнаруживаемых эффектов на RBC, гемоглобин, тромбоциты или нейтрофилы (**Фиг. 23H**).

**[0410]** Частичное ингибирование dCK в гематопозитических тканях предотвращает гематологическую токсичность dT и DI-39. Для дальнейшего изучения потенциальной гематологической токсичности комбинированной терапии, мы воспользовались преимуществом наших *dCK*<sup>-/-</sup> мышей (Austin et al., 2012). Такой подход позволил нам напрямую сравнивать эффекты на гематопозитическую систему, индуцированные полной потерей функции dCK у *dCK*<sup>-/-</sup> мышей с эффектами, индуцированными фармакологически у *dCK* мышей дикого типа (*dCK*<sup>+/+</sup>) используя DI-39 и dT. В эритроидной линии, комбинация DI-39/dT индуцировала заметно меньшее повреждение ДНК и генотоксичность у *dCK*<sup>+/+</sup> мышей, как измерено с помощью pH2A.X окрашивания (**Фиг. 24А**) и the микроядерного анализа, соответственно (**Фиг. 24В**), чем только удаление гена *dCK* у *dCK*<sup>-/-</sup> мышей. Данные полученные результаты показывают, что фармакологическое ингибирование активности dCK DI-39, самого или в комбинации с обработкой dT, лучше переносится, чем полное удаление ферментной активности dCK путем генной инактивации гена *dCK*.

**[0411]** Мы демонстрируем здесь требование для функционального пути реутилизации нуклеозида в Т-ALL и В-ALL клетках, чтобы предотвратить недостаточность dЦТФ пула, RS и апоптоз после фармакологического ингибирования *de novo* синтеза dЦТФ. Мы вводим DI-39, новый низкомолекулярный ингибитор dCK; dCK является киназой, необходимой для компенсационного метаболического переключателя, нацеленного dT-опосредованным DNP ингибированием, на NSP-зависимый биосинтез dЦТФ. Мы

исследуем, как DI-39 ингибирует dCK путем получения кристаллической структуры с высокой разрешающей способностью комплекса ингибитор-dCK. Мы демонстрируем терапевтическую эффективность совместно направленного взаимодействия как DNP, так и NSP биосинтетических путей дЦТФ, используя *in vivo* модели T-ALL и B-ALL, без выявляемой токсичности против нормальных гематopoэтических клеток-предшественников. Мы также описываем сопутствующий фармакодинамический PET анализ ферментной активности dCK, что позволяет неинвазивную *in vivo* визуализацию фармакологических вмешательств направленных на биосинтез дЦТФ.

**[0412]** Селективность комбинированной терапии DI-39/dT для лейкозных клеток по сравнению с нормальными гематopoэтическими клетками-предшественниками. Наша текущая рабочая модель, не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, чтобы объяснить механизм и наблюдаемую селективность комбинированной терапии для лейкозные клетки по сравнению с нормальными гематopoэтическими клетками-предшественниками схематически изображены на Фиг. 24, С и D. В соответствии с данной моделью, фармакологическое совместно направленное взаимодействие DNP (используя dT) и NSP (используя DI-39) является высоко эффективным в индуцировании летального RS против T- и B-ALL клеток и имеет минимальное действие на нормальные гематopoэтические клетки. Как показано с помощью <sup>18</sup>F-FAC PET визуализации активности dCK (Фиг. 21D; Фиг. 24D), DI-39 индуцировал частичное ингибирование dCK в нормальных BM клетках по сравнению с полной потерей активности dCK у *dCK*<sup>-/-</sup> мышей (Austin et al., 2012; Toy et al., 2010). Остаточная активность dCK в BM клетках после обработки DI-39 может быть достаточной, чтобы предотвратить более значительные сокращения, наблюдаемые для дЦТФ пулов гематopoэтических клеток-предшественников у *dCK*<sup>-/-</sup> мышей. Эта модель низкой или отсутствующей токсичности из-за частичного ингибирования терапевтической мишени напоминает последнюю работу, в которых гипоморфное подавление ATR было летальным для опухолевых тканей, подвергшихся воздействию онкогенного стресса, но имели лишь минимальную токсичность в отношении нормальных тканей (Bartek et al., 2012; Schoppa et al., 2012). Кроме того, повышенная восприимчивость ALL клеток к сниженному поступлению дЦТФ может отражать присущую неспособность этих лейкозных клеток установить эффективный ответ RS. Дополнительные исследования необходимы для того, чтобы точно определить дефекты в контрольных точках клеточного цикла, которые повышают восприимчивость ALL клеток к RS, индуцированному недостаточностью dNTP, по сравнению с

нормальными клетками гематопоетической клетки-предшественника, мы отмечаем присутствие инактивирующих мутаций *TP53* в нескольких исследуемых ALL клеточных линиях. В данном контексте, это дает основание предполагать, что в нормальных клетках с диким типом p53 отклонения в dNTP пулах, индуцированные ингибированием *de novo* синтеза пиримидина с помощью N-(фосфонацетил)-L-аспартата (PALA) создает необратимое повреждение ДНК, достаточное, чтобы активировать p53 и индуцировать экспрессию белков, что обеспечивает защитную блокировку в нескольких контрольных точках клеточного цикла (Hastak et al., 2008). В раковых клетках с дефектами в p53 или в его нижележащих эффекторах, неспособность блокировать синтез ДНК, когда пиримидиновые dNTP пулы истощаются, что приводит к необратимому повреждению ДНК, что в конечном итоге вызывает апоптоз (Hastak et al., 2008).

**[0413]** Потенциальные клинические последствия. Высокая авидность для dT была предварительно определена, как потенциальная метаболическая предрасположенность определенных видов рака, что приводит к клиническим исследованиям с использованием высоких доз dT, как потенциальных терапевтических (O'Dwyer et al., 1987). Продолжительные (более 5 дней) инфузии dT показали ответы у интенсивно предварительно обработанных T-ALL и у пациентов с кожной T-клеточной лимфомой, с побочными эффектами, которые встречались как терпимые, управляемые и обратимые (Chiuten et al., 1980; Kufe et al., 1980; Kufe et al., 1981). Однако, терапевтические ответы к dT у этих пациентов были, в общем, ограниченными и преходящими, потенциально отражая способность NSP, за счет dCK, чтобы компенсировать dЦТФ-истощающий эффект dT. Поскольку мощные низкомолекулярные ингибиторы dCK были недавно описаны (Murphy et al., 2013; Yu et al., 2010), последующие клинические исследования могут определить может ли анти-лейкозная активность dT, сообщаемая в T-ALL и у пациентов с подкожной T клеточной лимфомой быть значительно улучшена за счет фармакологической блокады пути реутилизации дезоксицитидина.

**[0414]** Сопутствующие диагностики для лечения нацеливающего биосинтетические пути dЦТФ при раке. Данные, представленные здесь, обеспечивают несколько примеров как *in vivo*, так и *in vitro* сопутствующих диагностик (или биомаркеров), которые могли бы помочь клинической трансляции комбинированной терапии DI-39/dT. Как пример, прямые оценки временных изменений в опухолевой активности dCK *in vivo* с PET выступают более полезными, чем традиционные фармакокинетические измерения в плазме для определения оптимального графика для комбинированной терапии DI-39/dT

(Фиг. 21). Поскольку наши PET анализы для мониторинга активности dCK уже переведены на людей (Schwarzenberg et al., 2011), подходы, аналогичные тем, которые описаны в наших доклинических экспериментах могут быть использованы в будущих клинических испытаниях неинвазивного мониторинга ингибирования dCK в тканях-мишенях *in vivo*. Повышающая регуляция уровней pChk1 и pH2A.X лейкозными клетками при обработке DI-39/dT (Фиг. 21F) может обеспечить дополнительные фармакодинамические биомаркеры повреждения ДНК, как показано ранее для ингибиторов PARP (Fong et al., 2009). Кроме того, так как эффективность терапии DI-39/dT зависит от способности опухолевых клеток захватывать большие количества dT и преобразовывать его в dTTP, PET визуализации с использованием <sup>18</sup>F-FLT (3'-дезоксидезокси-3'-фтортимидина), зонд для метаболизма dT (Shields et al., 1998), может позволить идентифицировать опухоли с необычно высокой avidностью для dT. Таким образом, <sup>18</sup>F-FLT PET может соответствовать предлагаемому определению прогнозируемому или обогатенному биомаркеру (de Bono and Ashworth, 2010) для терапий на основе dT.

[0415] Регуляция NSP за счет пути ответа на повреждение ДНК. Наши данные *in vitro* (Фиг. 21C) и *in vivo* (Фиг. 18, E и F) показывают, что, в СЕМ Т-ALL клетках, обработка dT повышающее регулировала активность NSP. Тогда как повышающая регуляция NSP за счет обработки dT может возникнуть в результате уменьшения отрицательной ответной реакции дЦТФ на активность dCK (Datta et al., 1989), также могут быть вовлечены дополнительные механизмы. Например, активность dCK увеличивается за счет обработки повреждающими ДНК агентами, которые не влияют на продуцирование дЦТФ через DNP (Csapo et al., 2003; Ooi et al., 1996). Кроме того, активация dCK после повреждения ДНК включает фосфорилирование киназы в серине 74 (Yang et al., 2012). Этот серин является частью мотива SQ/TQ, который является типичным сайтом фосфорилирования для ATM и ATR киназ в пути ответа на повреждение ДНК (DDR). В действительности, dCK был идентифицирован как прямая мишень этих киназ (Matsuoka et al., 2007). Таким образом, после повреждения ДНК, индуцированного высокой дозой dT, и, потенциально, другими генотоксическими терапиями, DDR путь может способствовать повышающей регуляции NSP за счет пост-трансляционной регуляции dCK с целью расширения dNTP пулов и облегчения восстановления ДНК. Если все правильно, эта модель дает логическое обоснование исследованию ингибиторов dCK в комбинации с лучевой терапией и другими генотоксическими терапиями.

**[0416]** Таким образом, наши результаты дают новое понимание нуклеотидного метаболизма лейкозных клеток, а также демонстрируют новую терапевтическую стратегию для преодоления избыточности и адаптивности нуклеотидного метаболизма в ALL и, возможно, в других гематологических злокачественных опухолях, в которых неконтролируемое расширение пула dTTP за счет обработки dT в результате приводит к потенциальной метаболической подверженности. Аналогичные подходы, которые вписываются в концептуальные рамки нацеливающей склонности неонкогена (Luo et al., 2009), могут быть применимы и к другим излишним биосинтетическим путям, которые обеспечивают преимущества для выживания в опухолевых клетках.

**[0417]** Клеточные линии и условия культивирования. Клетки человеческих клеточных линий CCRF-CEM, Jurkat, MOLT-4, RSR4;11 и TF-1 были получены из ATCC. Все клеточные линии поддерживали в 5 % FBS в RPMI-1640 и выращивали при 37 °C, 20 % O<sub>2</sub>, и 5 % CO<sub>2</sub>.

**[0418]** Мыши были разведены и размещены в специальных свободных от патогенов условиях и обрабатывались в соответствии с руководством протокола комитет по научным исследованиям на животных UCLA. *dCK<sup>-/-</sup>* были созданы и разведены как ранее описано, и возвратно скрещены с C57BL/6 мышами при *n*=7 поколений (Austin et al., 2012; Toy et al., 2010). Подобранная по возрасту (5-12 недель) WT и *dCK<sup>-/-</sup>* одноплетные животные использовали для оценки индукции RS за счет dT в ВМ миелоидных клетках.

**[0419]** Тимидин, 2'-дезокситидин, гидроксимочевина, 5-ФУ и цисплатин были приобретены у Sigma-Aldrich и готовили в ДМСО или воде. Лентивирусные кшПНК конструкции против dCK и ненацеливающий контроль были от Sigma-Aldrich. Для анализов на клеточных культурах, ингибиторы dCK ресуспендировали в ДМСО. Иммуноблоттинг выполняли как описано ранее (Austin et al., 2012). Антитела и реагенты для иммуноблоттинга были приобретены у следующих производителей: Cell Signaling Technology, фосфо-Chk1 Ser345, фосфо-Chk2 Thr68, Chk1, Chk2, анти-мышиный HRP-конъюгированный IgG, анти-кроличий HRP-конъюгированный IgG; Sigma-Aldrich, dCK, бета-актин; Abcam, TK1. Связанное антитело детектировали с использованием реагентов для обнаружения иммуноблоттинг хемилюминесценции (Pierce). Выделение и FACS-фенотипирование гематопозитических стволовых клеток, EryA и миелоида проводили, как описано ранее (Austin et al., 2012). Клетки p185<sup>BCR-ABL</sup>/Arf<sup>-/-</sup> были идентифицированы с помощью анти-CD19 (APC) антитела. Для анализа клеточного цикла, суммарное

содержание ДНК определяли, используя 1 мкг/мл DAPI или 20 мкг/мл пропидиума иодида, содержащего 5 мкг/мл РНКазы А. Окрашивание аннексином V выполняли в соответствии с протоколом производителя (BD Biosciences). Для микроядерного анализа, клетки, выделенные из костного мозга, окрашивали следующими антителами от eBioscience: Ter119 PerCP-Cy5,5 (TER-119), CD71 APC (R17217), CD45 PE-Cy7 (30-F11), CD61 PE (2C9.G3), CD11b APC-eFluor780 (M1/70). Клетки окрашивали, промывали и фиксировали раствором Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Клетки потом промывали и окрашивали 1 мкг/мл DAPI в PBS/2 % FBS. Все данные проточной цитометрии получали на четырех-лазерном LSRII цитометре (BD Biosciences) и анализировали, используя FlowJo (Tree Star).

**[0420]** NOD SCID гамма (NSG) мышам внутрибрюшинно вводили 2 г/кг dT; 75 мкл цельной крови получали через 0, 2, 4 и 8 ч путем пускания крови с ретро-орбитального синуса, используя гематокрит капиллярные пробирки. Цельную кровь сразу центрифугировали на 3000xg в течение 5 мин, чтобы отделить сыворотку; 30 мкл сыворотки смешивали с 1 мл смеси метанол:ацетонитрил (1:9), встряхивали в течение 2 мин, центрифугировали на 14000xg в течение 4 мин при 4 °C. Экстракцию повторяли, и объединенный супернатант сушили в вакууме центрифугированием. Остаток растворяли в 100 мкл воды, фильтровали и элюировали используя колонку Waters microBondapak C18 с градиентом подвижной фазы от 2 % метанола до 50 % метанола в течение десяти минут при скорости потока 1,5 мл/мин. Тимидин был обнаружен по интенсивности оптической плотности (254 нм), и концентрации интерполировали из стандартных кривых.

**[0421]** Для того, чтобы определить фармакокинетический профиль DI-39, C57Bl/6 самкам мышей дозировали DI-39 путем внутрибрюшинной инъекции в соответствии с протоколом, который был описан ранее (Murphy et al., 2013). Доза препарата включает 10 % ДМСО и 40 % каптизола (SBE- $\beta$ -CD, полианионный переменено замещенный сульфобутиловый простой эфир  $\beta$ -циклодекстрина (Stella and He, 2008)) в воде. Примерно 75 мкл цельной крови получали в разные точки времени начиная с 5 до 360 минут путем пускания крови с ретро-орбитального синуса, используя гематокрит капиллярные пробирки. Приблизительные значения площади под кривой (AUC), почечный клиренс (CL), время полувыведения ( $T_{1/2}$ ), максимальную концентрацию в плазме ( $C_{max}$ ) и время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) рассчитывали, используя Boomer/Multi-Forte ПК функции от Microsoft Excel.

**[0422]** Для исследования опухолевого и плазменного захвата DI-39, используя ЖХ/МС/МС-МРМ, несущим опухоль NSG мышам внутрибрюшинно вводили 50 мг/кг DI-39 за 0, 2, 4, 8 и 12 часов перед умерщвлением. Целые опухоли вырезали, взвешивали и гомогенизировали используя равного объема 2 мм в диаметре из нержавеющей стали бусинки (Next Advance) в 1 мл охлажденной льдом смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.), содержащей 0,5 пмоль/мкл внутреннего стандарта DI-70 (2-(((2-(4-метокси-3-(2-(2-(2-метоксиэтокси)этокси)этокси)фенил)-5-пропилтиазол-4-ил)метил)тио)пиримидин-4,6-диамин,  $C_{25}H_{35}N_5O_5S_2$ , ММ = 549,2 г/моль, в собственном синтезированном DI-39 аналоге) в гомогенизаторе Bullet Blender (Next Advance). Тканевые гомогенаты оставляли на ночь при 4° С в шейкере и на следующий день центрифугировали на 20 000xg в течение 10 мин. Супернатант (700 мкл) переносили в чистую пробирку и упаривали досуха в вакуумной центрифуге. Остаток восстанавливали в 100 мкл смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.). Для измерений плазмы, ~100 мкл крови собирали путем пуска крови с ретро-орбитального синуса, используя капиллярные пробирки для сбора крови. Образцы центрифугировали на 20 000xg в течение 5 мин, и 30 мкл супернатанта переносили в чистую пробирку. Образец смешивали с 500 мкл охлажденной льдом смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.), содержащей внутренний стандарт, и обрабатывали таким же образом, как и опухолевые гомогенаты. Калибровочные стандарты получали методом добавления рабочего исходного раствора DI-39 в опухолевые гомогенаты и плазму от необработанных мышей, получая следующие диапазоны: 0,02 - 20 пмоль/мкл. Образцы (5 мкл) впрыскивали в колонку с обращенной фазой (Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition (RRHD) Eclipse Plus C18, 2,1 x 50 мм, 1,8 мкм), уравновешенную смесью вода/ацетонитрил/муравьиная кислота, 95/5/0,1, и элюировали (200 мкл/мин) с увеличением концентрации растворителя В (ацетонитрил/муравьиная кислота, 100/0,1, об./об.: мин/ % ацетонитрила; 0/5, 0/5, 2/5, 8/80, 9/80, 10/5, 12/5). Поток, выходящий из колонки, направляли в источник электрораспыления ионов (Agilent Jet Stream), подключенный к тройному квадрупольному масс-спектрометру (Agilent 6460 QQQ), работающему в режиме положительных ионов MRM. Ионные переходы для DI-39 и DI-70 (525,2→383,3 и 550,2→408,2 соответственно) записывали в предварительно оптимизированных условиях. Площади пиков DI-39 нормализовали по внутреннему стандарту и массе опухоли.

**[0423]** Эксперимент с использованием клеток CCRF-CEM чтобы измерить захват DI-39 в клеточной культуре по аналогичному протоколу, как описана выше. CCRF-CEM клетки

культивировали в 5 % FBS в RPMI-1640 средах, дополненных 1 мкМ DI-39 в течение 10, 30, 40 и 60 мин перед экстракцией клеток. Для некоторых образцов, среды с 1 мкМ DI-39 были удалены и клетки промывали три раза в PBS перед добавлением свежих сред без DI-39 в течение 60 минут. Клетки экстрагировали и гомогенизировали в 1 мл охлажденной льдом смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.), содержащей 0,5 пмоль/мкл того же внутреннего стандарта как упоминалось ранее. Экстракт клеток оставляли на ночь при 4° С в шейкере и на следующий день центрифугировали на 20 000xg в течение 10 мин. Супернатант переносили в чистую пробирку и упаривали досуха в вакуумной центрифуге. Остаток восстанавливали в 100 мкл смеси ацетонитрил/вода (50/50, об./об.). DI-39 определяли количественно, как описано выше.

**[0424]** СЕМ клетки переносили в RPMI с добавлением 5 % диализованной FCS содержащей 10 мкМ равномерно меченого [U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-дезоксцитидина (Cambridge Isotopes), 2 г/л равномерно меченой [U-<sup>13</sup>C]-глюкозы (Cambridge Isotopes) и 0, 50 или 250 мкМ dT. Для анализа dNTP, клетки экстрагировали в течение ночи при -20 °С 75 % метанолом. Экстракты затем нагревали в кипящей воде в течение 3 мин, осаждали, и супернатанты переносили и сушили в вакууме центрифугированием. Для анализа ДНК, клетки собирали и геномную ДНК экстрагировали, используя Quick-gДНК MiniPrep набор (Zymo Research). Геномную ДНК затем расщепляли до нуклеозидов, используя набор ДНК Degradase Plus (Zymo Research).

**[0425]** Для исследований *in vivo*, несущим опухоль мышам вводили 200 мкл 2,5 мМ [U-<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N]-дезоксцитидина за 30 мин до умерщвления. Опухоли собирали, механически расщепляли на отдельные клетки, и получали клеточные индексы. Экстракцию ДНК проводили как описано выше.

**[0426]** Образцы гидролиза ДНК разбавляли 1/1 растворителем А (вода/муравьиная кислота, 100/0,2, об./об.) и анализировали, используя модифицированную версию ранее описанного способу (Cohen et al., 2009) в котором аликвоты раствора (10 мкл) впрыскивали в графитовую колонку с пористым углем (Thermo Hypercarb, 100 x 2,1 мм, размер частиц 3 микрона), уравновешенную растворителем А, и элюировали (300 мкл/min) с увеличением концентрации растворителя В (ацетонитрил/мин/ % В; 0/0, 6/60, 6,1/100, 9/100, 9,1/0, 10/0). Поток, выходящий из колонки, направляли в поток Agilent Jet связанный с Agilent 6460 QQQ работающим в режиме положительных ионов MRM. Послу реализации изобретения контроля времен удерживания, используя аутентичные

стандарты, площади пиков  $MH^+$ →ионные переходы фрагмента для изотопомеров dC ( $M_0$ , 228,1→112,1;  $M_1$ , 229,1→112,1;  $M_2$ , 230,1→112,1;  $M_3$ , 231,1→112,1;  $M_4$ , 232,1→112,1;  $M_5$ , 233,1→112,1;  $M_6$ , 234,1→113,1;  $M_7$ , 235,1→114,1;  $M_8$ , 236,1→115,1; 236,1→115,1;  $M_{11}$ , 239,1→118,1; и  $M_{12}$ , 240,1→119,1) регистрировали используя программное обеспечение поставляемое производителем прибора (Agilent MassHunter), и нормализовали на число клеток. Детектировали изотопомеры dC  $M_3$  через  $M_8$  для DNP и  $M_{11}$  через  $M_{12}$  для NSP и использовали для анализа данных.

**[0427]** Для анализа свободного dNTP использовали модифицированную версию того же ранее описанного способа (Cohen et al., 2009), в котором высушенные образцы снова растворяли в растворителе С (100 мкл, 5 мМ гексилламин, 0,5 % мМ диэтиламин, рН 10,0) и аликвоты (10 мкл) впрыскивали в графитовую колонку с пористым углем (Thermo Nurcarb, 150 x 2,1 мМ, размер частиц 3 микрона), уравновешенную растворителем С и элюировали (150 мкл/мин) с увеличением концентрации растворителя D (ацетонитрил/мин/ % D; 0/0, 5/0, 25/40, 25,1/100, 30/100, 30,1/0, 40/0). Поток, выходящий из колонки направляли в тот самый инструмент, описанный выше, который работает в режиме отрицательных ионов. После реализации изобретения контроля времен удерживания, используя аутентичные стандарты, интенсивности предварительно выбранных  $(M-H)^-$ →ионных переходов фрагмента для различных дЦТФ изотопомеров ( $M_0$ , 466,0→159,0;  $M_1$ , 467,0→159,0;  $M_2$ , 468,0→159,0;  $M_3$ , 469,0→159,0;  $M_4$ , 470,0→159,0;  $M_5$ , 471,0→159,0;  $M_6$ , 472,0→159,0;  $M_7$ , 473,0→159,0;  $M_8$ , 474,0→159,0;  $M_{10}$ , 478,0→159,0;  $M_{11}$ , 479,0→159,0; и  $M_{12}$ , 478,0→159,0) регистрировали, снова используя программное обеспечение, поставляемое производителем прибора (Agilent MassHunter), и нормализовали на число клеток. Детектировали изотопомеры дЦТФ  $M_5$  через  $M_8$  для DNP и  $M_{12}$  для NSP и использовали для анализа данных. Изотопомеры  $M_3$  и  $M_4$  не детектировали.

**[0428]** Измерения внутриклеточного dNTP пула проводили как описано ранее (Austin et al., 2012).

**[0429]** Кометный анализ выполняли в соответствии с протоколом набора реагентов Trevigen CometAssay в щелочных условиях. Для количественного определения, четыре случайные секции каждого слайда, содержащего >100 клетки, были изображены, и момент хвоста по Оливе получали, используя программное обеспечение TriTek Cometscore.

**[0430]** Ген, кодирующий гуманизированную секретированную *Gaussia* люциферазу (sGluc), pCMV-GLuc-1 (Nanolight Technology), субклонировали в MSCV-IRES-GFP ретровирусный вектор. Phoenix-Ampho клетки трансфицировали с генерированным вектором, используя реагент трансфекции липофектамин (Invitrogen, Grand Island, NY). Через сорок восемь часов после трансфекции, вирус собирали и использовали для трансдукции CEM dCK<sup>wt</sup> и CEM dCK<sup>low</sup> клеток. GFP положительные клетки сортировали с FACS Aria II сортировщиком клеток (BD Biosciences).

**[0431]** C4S S74E dCK вариант, используемый для кристаллографических исследований, экспрессировали и чистили, как описано в другом месте. (Nomme et al., 2014). Кристаллизацию, сбор рентгеновских данных и уточнения также выполняли как описано в Nomme et al. Briefly, кристаллы dCK в комплексе с UDP, MgCl<sub>2</sub> и 2,5-кратный избыток DI-39 ингибитор были выращены с использованием способа паровой диффузии висячей капли при 12 °C. Запасной раствор содержал 0,9-1,5 М тринатрия цитрат дегидрат и 25 мМ HEPES (pH 7,5). Дифракционные данные собирали в Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory на Life Sciences-Collaborative Access Team (LS-CAT) с пучком синхротронного излучения 21 ID-G.

**[0432]** Опухоли CEM ксенотрансплантата развивали у 8 - 12 недельных самок NSG мышей путем имплантации 2 x 10<sup>6</sup> CEM dCK<sup>wt</sup>-sGluc-GFP и/или dCK<sup>low</sup>-sGluc-GFP клеток в 100 мкл равного объема Matrigel (BD Biosciences) и RPMI подкожно в фланги. Рост опухоли контролировали ежедневно путем измерения штангенциркулем ( $[(\text{длина} \times \text{ширина}^2)/2]$ ) и анализ люциферазы *Gaussia* (GLuc) в крови (Tannous, 2009). Десять мкл крови собирали через насечку в хвостовой вене и смешивали с 2 мкл 50 мМ ЭДТУ. Один мкл крови смешивали с 99 мкл PBS и переносили в 96 лунковый OptiPlate (Perkin Elmer). Сто мкл 20 мкМ целентеразинового субстрата смешивали и измеряли активность люциферазы, используя микропланшет-ридер для люминесценции пластины SpectraMax L (Molecular Devices). Модели системной опухоли создавали путем внутривенной инъекции 10<sup>6</sup> CEM dCK<sup>wt</sup>-sGluc-GFP или dCK<sup>low</sup>-sGluc-GFP в 100 мкл RPMI. Тимидин (2 г/кг) вводили в физиологическом растворе и DI-39 в смеси 1,4 % ДМСО и 40 % каптизола (Ligand Pharmaceuticals).

**[0433]** Опухоли из CEM ксенотрансплантата собирали и фиксировали в течение ночи в 10 % буферном растворе формалина. Образцы затем заливали парафином и 5 мкм срезы устанавливали на предметные стекла. TUNEL окрашивание выполняли в соответствии с

протоколом производителя (Roche Applied Science). Окрашенные слайды впоследствии сканировали на Aperio ScanScope AT (Aperio) и анализ проводили, используя Definiens Tissue Studio 64 (Dual) 3,5 (Definiens AG).

**[0434]** Анализы dCK киназы и захвата выполняли как описано ранее (Shu et al., 2010).

**[0435]** Всех мышей анестезировали и цельную кровь получали через пункцию сердца. Для определения количества периферической крови образцы собирали в пробирки, содержащие ЭДТУ и отправляли в UCLA подразделение Lab Animal Medicine для анализа.

**[0436]** PET/CT исследования выполняли как описано ранее (Radu et al., 2008; Shu et al., 2010).

**[0437]** Фармакокинетические исследования DI-39 на мышах выполняли как описано ранее (Murphy et al., 2013).

**[0438]** Все статистические данные представлены как средние значения биологических повторов со стандартной ошибки среднего ( $\pm$  SEM), если не указано иное. Достоверности значений *P* рассчитывали из нескольких повторов в пределах набора данных, типичных для нескольких независимых экспериментов, как показано, используя один пример функции t-критерия в GraphPad Prism 5 (программное обеспечение GraphPad).

**[0439]** Список литературы для примера 2:

Austin, W.R., A.L. Armijo, D.O. Campbell, A.S. Singh, T. Hsieh, D. Nathanson, H.R. Herschman, M.E. Phelps, O.N. Witte, J. Czernin, and C.G. Radu. 2012. Nucleoside salvage pathway kinases regulate hematopoiesis by linking nucleotide metabolism with replication stress. *J Exp Med.* 209:2215-28.

Bartek, J., M. Mistrik, and J. Bartkova. 2012. Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment. *Nature structural & molecular biology.* 19:5-7.

Boulos, N., H.L. Mulder, C.R. Calabrese, J.B. Morrison, J.E. Rehg, M.V. Relling, C.J. Sherr, and R.T. Williams. 2011. Chemotherapeutic agents circumvent emergence of dasatinib-resistant BCR-ABL kinase mutations in a precise mouse model of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 117:3585-95.

Chiuten, D.F., P.H. Wiernik, D.S. Zaharko, and L. Edwards. 1980. Clinical phase I-II and pharmacokinetic study of high-dose thymidine given by continuous intravenous infusion. *Cancer Res.* 40:818-22.

- Cohen, S., M. Megherbi, L.P. Jordheim, I. Lefebvre, C. Perigaud, C. Dumontet, and J. Guitton. 2009. Simultaneous analysis of eight nucleoside triphosphates in cell lines by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877:3831-40.
- Csapo, Z., G. Keszler, G. Safrany, T. Spasokoukotskaja, I. Talianidis, M. Staub, and M. Sasvari-Szekely. 2003. Activation of deoxycytidine kinase by gamma-irradiation and inactivation by hyperosmotic shock in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol.* 65:2031-9.
- Datta, N.S., D.S. Shewach, B.S. Mitchell, and I.H. Fox. 1989. Kinetic properties and inhibition of human T lymphoblast deoxycytidine kinase. *J Biol Chem.* 264:9359-64.
- de Bono, J.S., and A. Ashworth. 2010. Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature.* 467:543-9.
- Fong, P.C., D.S. Boss, T.A. Yap, A. Tutt, P. Wu, M. Mergui-Roelvink, P. Mortimer, H. Swaisland, A. Lau, M.J. O'Connor, A. Ashworth, J. Carmichael, S.B. Kaye, J.H. Schellens, and J.S. de Bono. 2009. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *The New England journal of medicine.* 361:123-34.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144:646-74.
- Hastak, K., R.K. Paul, M.K. Agarwal, V.S. Thakur, A.R. Amin, S. Agrawal, R.M. Sramkoski, J.W. Jacobberger, M.W. Jackson, G.R. Stark, and M.L. Agarwal. 2008. DNA synthesis from unbalanced nucleotide pools causes limited DNA damage that triggers ATR-CHK1-dependent p53 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:6314-9.
- Jain, M., R. Nilsson, S. Sharma, N. Madhusudhan, T. Kitami, A.L. Souza, R. Kafri, M.W. Kirschner, C.B. Clish, and V.K. Mootha. 2012. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science.* 336:1040-4.
- Jordheim, L.P., E. Cros, M.H. Gouy, C.M. Galmarini, S. Peyrottes, J. Mackey, C. Perigaud, and C. Dumontet. 2004. Characterization of a gemcitabine-resistant murine leukemic cell line: reversion of in vitro resistance by a mononucleotide prodrug. *Clin Cancer Res.* 10:5614-21.
- Kamphorst, J.J., J. Fan, W. Lu, E. White, and J.D. Rabinowitz. 2011. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry analysis of fatty acid metabolism. *Anal Chem.* 83:9114-22.

- Kufe, D.W., P. Beardsley, D. Karp, L. Parker, A. Rosowsky, G. Canellos, and E. Frei, 3rd. 1980. High-dose thymidine infusions in patients with leukemia and lymphoma. *Blood*. 55:580-9.
- Kufe, D.W., M.M. Wick, S. Moschella, and P. Major. 1981. Effect of high-dose thymidine infusions in patients with mycosis fungoides. *Cancer*. 48:1513-6.
- Luo, J., N.L. Solimini, and S.J. Elledge. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 136:823-37.
- Maddocks, O.D., C.R. Berkers, S.M. Mason, L. Zheng, K. Blyth, E. Gottlieb, and K.H. Vousden. 2012. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*. 493:542-6.
- Matsuoka, S., B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, and S.J. Elledge. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 316:1160-6.
- Murphy, J.M., A.L. Armijo, J. Nomme, C.H. Lee, Q.A. Smith, Z. Li, D.O. Campbell, H.I. Liao, D.A. Nathanson, W.R. Austin, J.T. Lee, R. Darvish, L. Wei, J. Wang, Y. Su, R. Damoiseaux, S. Sadeghi, M.E. Phelps, H.R. Herschman, J. Czernin, A.N. Alexandrova, M.E. Jung, A. Lavie, and C.G. Radu. 2013. Development of new deoxycytidine kinase inhibitors and noninvasive in vivo evaluation using positron emission tomography. *J Med Chem*. 56:6696-708.
- Nomme, J., J.M. Murphy, Y. Su, N.D. Sansone, A.L. Armijo, S.T. Olson, C. Radu, and A. Lavie. 2014. Structural characterization of new deoxycytidine kinase inhibitors rationalizes the affinity-determining moieties of the molecules. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 70:68-78.
- O'Dwyer, P.J., S.A. King, D.F. Hoth, and B. Leyland-Jones. 1987. Role of thymidine in biochemical modulation: a review. *Cancer Res*. 47:3911-9.
- Ooi, K., T. Ohkubo, M. Higashigawa, H. Kawasaki, and M. Sakurai. 1996. Increased deoxycytidine kinase activity by etoposide in L1210 murine leukemic cells. *Biol Pharm Bull*. 19:1382-3.
- Radu, C.G., C.J. Shu, E. Nair-Gill, S.M. Shelly, J.R. Barrio, N. Satyamurthy, M.E. Phelps, and O.N. Witte. 2008. Molecular imaging of lymphoid organs and immune activation by positron emission tomography with a new [<sup>18</sup>F]-labeled 2'-deoxycytidine analog. *Nat Med*. 14:783-8.

- Reichard, P. 1988. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 57:349-374.
- Schoppy, D.W., R.L. Ragland, O. Gilad, N. Shastri, A.A. Peters, M. Murga, O. Fernandez-Capetillo, J.A. Diehl, and E.J. Brown. 2012. Oncogenic stress sensitizes murine cancers to hypomorphic suppression of ATR. *The Journal of clinical investigation.* 122:241-52.
- Schwarzenberg, J., C.G. Radu, M. Benz, B. Fueger, A.Q. Tran, M.E. Phelps, O.N. Witte, N. Satyamurthy, J. Czernin, and C. Schiepers. 2011. Human biodistribution and radiation dosimetry of novel PET probes targeting the deoxyribonucleoside salvage pathway. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging.* 38:711-21.
- Shields, A.F., J.R. Grierson, B.M. Dohmen, H.J. Machulla, J.C. Stayanoff, J.M. Lawhorn-Crews, J.E. Obradovich, O. Muzik, and T.J. Mangner. 1998. Imaging proliferation in vivo with [<sup>18</sup>F]FLT and positron emission tomography. *Nature medicine.* 4:1334-6.
- Shu, C.J., D.O. Campbell, J.T. Lee, A.Q. Tran, J.C. Wengrod, O.N. Witte, M.E. Phelps, N. Satyamurthy, J. Czernin, and C.G. Radu. 2010. Novel PET probes specific for deoxycytidine kinase. *J Nucl Med.* 51:1092-8.
- Stella, V.J., and Q. He. 2008. Cyclodextrins. *Toxicologic pathology.* 36:30-42.
- Tannous, B.A. 2009. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 4:582-91.
- Toy, G., W.R. Austin, H.I. Liao, D. Cheng, A. Singh, D.O. Campbell, T.O. Ishikawa, L.W. Lehmann, N. Satyamurthy, M.E. Phelps, H.R. Herschman, J. Czernin, O.N. Witte, and C.G. Radu. 2010. Requirement for deoxycytidine kinase in T and B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:5551-6.
- Vander Heiden, M.G. 2011. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* 10:671-84.
- Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein. 1927. The Metabolism of Tumors in the Body. *The Journal of general physiology.* 8:519-30.
- Williams, R.T., M.F. Roussel, and C.J. Sherr. 2006. Arf gene loss enhances oncogenicity and limits imatinib response in mouse models of Bcr-Abl-induced acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:6688-93.

Xu, Y.Z., P. Huang, and W. Plunkett. 1995. Functional compartmentation of dCTP pools.

Preferential utilization of salvaged deoxycytidine for DNA repair in human lymphoblasts. *J Biol Chem.* 270:631-7.

Yang, C., M. Lee, J. Hao, X. Cui, X. Guo, C. Smal, F. Bontemps, S. Ma, X. Liu, D. Engler, W.B. Parker, and B. Xu. 2012. Deoxycytidine kinase regulates the G2/M checkpoint through interaction with cyclin-dependent kinase 1 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 40:9621-32.

Yu, X.-C., M. Miranda, Z. Liu, S. Patel, N. Nguyen, K. Carson, Q. Liu, and J.C. Swaffield. 2010. Novel Potent Inhibitors of Deoxycytidine Kinase Identified and Compared by Multiple Assays. *J. Biomol. Screening.* 15:72-79.

### 3. Пример 3

**[0440]** Клетки млекопитающих исходят двух основных путей для продуцирования и сохранения дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP) для репликации и восстановления ДНК: *de novo* и путь реутилизации нуклеозида.<sup>1</sup> Путь *de novo* продуцирует dNTP из глюкозы и аминокислот. Путь реутилизации нуклеозида продуцирует dNTP из предварительно сформированных дезоксирибонуклеозидов, присутствующих во внеклеточном пространстве.<sup>1</sup> Первый ферментативная стадия в цитозольном пути реутилизации дезоксирибонуклеозида катализируется дезоксицитидинкиназой (dCK) и тимидинкиназой 1 (TK1).<sup>2</sup> dCK катализирует 5'-фосфорилирование дезоксицитидина (dC), дезоксигуанозина (dG) и дезоксиаденозина (dA) до их монофосфатных форм, демонстрируя самую высокую аффинность для dC.<sup>3</sup> Монофосфат дезоксирибонуклеотиды впоследствии фосфорилируются до их соответствующих ди- и трифосфатных форм за счет других киназ.<sup>4,5</sup> Мы показали, что dCK и TK1 играют важную роль в кроветворении путем регуляции биосинтеза dNTP в лимфоидных и эритроидных клетках-предшественниках.<sup>6,7</sup> В дополнение к своей физиологической роли в нуклеотидном метаболизме, dCK фосфорилирует несколько клинически важных противовирусных и противоопухолевых пролекарств аналогов нуклеозидов (например, гемцитабин, децитабин, флударабин, цитарабин, клофарабин); фосфорилирование dCK критически необходимо для активации данных пролекарств.<sup>8</sup> Недавно, dCK был вовлечен в регуляцию контрольной точки G2/M в раковых клетках в ответ на повреждение ДНК.<sup>9</sup> Роль dCK в гемопоэзе и раке привело к нашему интересу в разработке низкомолекулярного ингибитора этой киназы. Такие ингибиторы dCK могут представлять

новые терапевтические агенты для злокачественных опухолей и иммунных нарушений. Насколько нам известно, о нескольких ингибиторах dCK сообщалось,<sup>10,11,12</sup> и только один<sup>13</sup> продемонстрировал ингибирование активности dCK *in vivo*.

**[0441]** Позитронно-эмиссионная томография (PET) является неинвазивным методом *in vivo* визуализации, широко используемым для диагностики, постановки, рестадирования и мониторинга терапии различных заболеваний.<sup>14,15</sup> Тогда как PET с использованием радиоактивной метки 2-<sup>18</sup>F-фтор-2-дезоксид-глюкозы (<sup>18</sup>F-FDG)<sup>16,17</sup> стало важным средством мониторинга диагностики и лечения при раке<sup>18,19,20,21</sup>, другое возникающее применение PET касается его использования в обнаружении и разработке лекарственного средства. Таким образом, путем содействия более быстрому и эффективному принятию решения на ранних стадиях процесса разработки/развития лекарственного средства, PET может ускорить продвижение перспективных кандидатов и уменьшить неудачи.<sup>22,23,24</sup> Например, PET могут использовать, чтобы продемонстрировать необходимость модифицировать ведущие кандидаты в начале процесса разработки лекарственного средства предоставляя возможность неинвазивных оценок фармакодинамических (PD) и/или фармакокинетических (PK) свойств лекарственного средства. В конкретном контексте нашей разработки лекарственного средства и программы развития с центром в dCK, PET может играть особенно важную роль, принимая во внимание наличие утвержденных PET биомаркеров для оценки активности dCK *in vivo*. Данные PET PD биомаркеры активности dCK включают серию субстратов <sup>18</sup>F-фтор-арабинофуранозилцитозиновых аналогов dCK, разработанных нашей группой<sup>25</sup>, которые включают <sup>18</sup>F-1-(2'-дезоксид-2'-Фторарабинофуранозил) Цитозин (<sup>18</sup>F-FAC)<sup>26</sup> и <sup>18</sup>F-L-1-(2'-дезоксид-2'-Фторарабинофуранозил) Цитозин (<sup>18</sup>F-L-FAC)<sup>27</sup>. в данном документе мы описываем разработку эффективных ингибиторов dCK и демонстрируем их *in vivo* эффективность, используя <sup>18</sup>F-L-FAC PET как неинвазивный и клинически применимый PD биомаркер.

**[0442]** Идентификация соединения-прототипа 15с. Для идентификации новых низкомолекулярных ингибиторов dCK, мы выполняли скрининг с высокой пропускной способностью (HTS) набора выбранных химических библиотек общей сложностью ~90 000 малых молекул. Мы провели скрининг библиотеки функционального ингибитора dCK, используя анализ сочетания люциферазы светлячка с рекомбинантный человеческим dCK ферментом.<sup>28</sup> В этом анализе, ингибирование dCK предотвращает истощение АТФ за счет dCK, таким образом в результате приводя к более высоким люминесцентным

сигналам в положительных лунках. Скрининг дал два хита соединений, **1** и **2**, которые были проверены на ингибирование захвата тритиевого дезоксицитидина ( $^3\text{H-dC}$ ) с микромолярной эффективностью в L1210 мышинной лейкозной клеточной линии (**Фигура 26**).

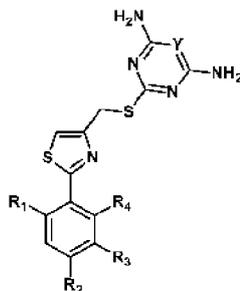
[0443] На основании этих результатов, исследовали пять коммерчески доступных соединений, содержащих аналогичные структурные остовы; их значения  $\text{IC}_{50}$  против клеток L1210 определяли путем измерения ингибирования захвата  $^3\text{H-dC}$  (**Фигура 26**). Поразительно, соединения **6** и **7** были неактивными, предполагая, что бис-амино функциональность пиримидинового кольца является критической для ингибирования dCK. Основываясь на этих результатах, мы приступили к изучению взаимосвязи структура-активность (SAR), чтобы разработать ведущую структуру, которая может быть дополнительно оптимизирована до соединений с сильной активностью *in vivo*.

[0444] Сначала мы изучили два основных структурных класса соединений, пиримидинов и 1,3,5-триазинов (**Таблица 5**). Две клеточные линии использовали для определения значений  $\text{IC}_{50}$ : L1210 мышинные лейкозные клетки и CCRF-CEM человеческие Т-лимфобластные клетки острого лейкоза. Почти во всех случаях, замещение пиримидинового кольца на 1,3,5-триазиновый мотив уменьшало ингибиторную активность dCK; в некоторых случаях наблюдалось приблизительно 2-разовое уменьшение эффективности. Следовательно, пиримидиновый мотив был использован как предпочтительный остов в будущем. На данной стадии SAR, присутствие фторэтоксидной боковой цепью в фенильном кольце рассматривалась для возможных целей введения  $^{18}\text{F}$ -радиометки. Замещения вокруг фенильного кольца по отношению к положению фторэтоксидной боковой цепи были также исследованы. Перемещение фторэтоксидной боковой цепи из пара-положения в **8a** в мета-положение в **9a** увеличивало ингибиторную активность приблизительно в 2-раза. Кроме того, было очевидно, что алкокси заместители в пара-положении были лучше, чем алкильные фрагменты, так как соединение **11a** имело значительно более низкую активность, чем или метокси **9a** или этокси **10a** аналоги. Соединение **12a**, которое содержит боковую цепь, которая была продлена на один атом углерода с образованием фторпропокси группы в мета-положении, дало несколько большую ингибирующую активность, хотя и не значительное увеличение от соединений **9a** и **10a**. Замещение в орто-положение фенильного кольца, например, в соединениях **13a** и **14a**, в результате приводило к значительно более низкой ингибиторной активности dCK, приблизительно 10-кратное снижение эффективности наблюдалось для соединения **14a** по

сравнению с **9a**. Общую схему синтеза для соединений в **Таблице 5** можно найти в вспомогательной информации.

**[0445]** В то время как присутствие фтора в малой молекуле могут в конечном счете позволить синтез  $^{18}\text{F}$ -изотополога ингибитора dСК, введение фтора также влияет почти на все физические и ADME (адсорбция, распределение, метаболизм и экскреция) свойства соединения.<sup>29</sup> Способность фтора повышать метаболическую стабильность стала все более очевидной в последние годы.<sup>30</sup> Таким образом, был синтезирован ряд соединений, которые содержали фтор, присоединенный непосредственно к ароматическому кольцу ингибиторов, а не связан с этокси боковой цепью (соединения **16 - 18**, **Таблица 6**). Для каждого соединения в этой серии, набор из трех производных (**a - c**) были синтезированы; в каждом случае группы в 5-положении тиазола был или метильный, этильный или пропильный заместитель. Для соединений **15a - c** фторэтокс боковая цепь сохранялась в мета-положении фенильного кольца, как была метокси группа в пара-положении в связи с благоприятным ингибитором является результатом начального SAR в **Таблице 5**.

**[0446]** Таблица 5: *in vitro* биологические данные на L1210 и СЕМ клетках для соединений 8-14



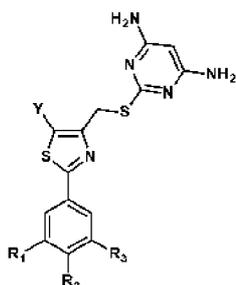
Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	IC <sub>50</sub> (мкМ) L1210 клетки		IC <sub>50</sub> (мкМ) СЕМ клетки	
					a Y = CH	b Y = N	a Y = CH	b Y = N
<b>8</b>	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	OCH <sub>3</sub>	H	0.808 (= 0.406)	1.612 (= 0.543)	0.421 (= 0.075)	0.534 (= 0.012)
<b>9</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	H	0.538 (= 0.014)	0.528 (= 0.015)	0.230 (= 0.042)	0.506 (= 0.158)
<b>10</b>	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	H	0.513 (= 0.100)	1.226 (= 0.450)	0.251 (= 0.020)	0.512 (= 0.409)
<b>11</b>	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	H	2.381 (= 0.042)	3.201 (= 0.566)	1.960 (= 1.001)	1.922 (= 0.573)
<b>12</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	H	0.330 (= 0.160)	0.603 (= 0.140)	0.197 (= 0.109)	0.297 (= 0.020)
<b>13</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	H	1.445 (= 0.060)	2.649 (= 0.902)	1.041 (= 0.084)	0.849 (= 0.183)
<b>14</b>	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	H	OCH <sub>3</sub>	5.469 (= 1.536)	n.o. <sup>b</sup>	2.367 (= 0.238)	n.o. <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ингибиторная активность, измеренная путем захвата <sup>3</sup>H-дезокситидина (<sup>3</sup>H-dC) мышинными L1210 клетками и CCRF-СЕМ человеческими клетками. Сообщаемые значения являются средними ± SD от, по меньшей мере, n = 2 независимых экспериментов. <sup>b</sup>n.o. = не определяли (соединения не были синтезированы)

**[0447]** Увеличение неполярной функциональности в 5-положении тиазола в результате приводило к возрастанию ингибиторной активности (Таблица 6). Значения IC<sub>50</sub> в CCRF-СЕМ клетках иллюстрируют ту же тенденцию в эффективности как наблюдалось в L1210 клетках с одним исключением; комплект **16** показывает небольшое различие между метильным, этильным или пропильным заместителями. Однако, для всех соединений, против L1210 клеток, пропильный заместитель давал лучшую ингибиторную активность, чем соответствующие метильные производные. Наилучшим примером в L1210 клетках было 12-кратное увеличение активности при сравнение соединения **15c** с соединением **15a**. Кроме того, сравнения между пропильными заместителями против их соответствующих метильных производных в CCRF-СЕМ клетках также показали

возрастающую ингибиторную тенденцию в активности: 6-кратную (сравнение **17c** с **17a**) или 3-кратную (сравнение **18c** с **18a**). Наиболее сильный эффект от модификации в 5-положении тиазольного кольца было изменение, продемонстрированное от **9a** в Таблице 1 - **15c** в Таблице 6, где замещение водорода на пропильный фрагмент в результате приводило к 180-кратному увеличению эффективности в L1210 клетках. Кроме того, удаление фторэтокси боковой цепи (например, серии соединений **16** - **18**) в результате приводило к значительному снижению эффективности в обеих клеточных линиях. Соединение **15c**, наиболее эффективное соединение в этой серии, содержит как фторэтокси боковую цепь в мета-положении в фенильном кольце, так и также пропильную группу в 5-положении тиазольного кольца.

[0448] Таблица 6: *in vitro* биологические данные на L1210 и CEM клетках для соединений 15-18



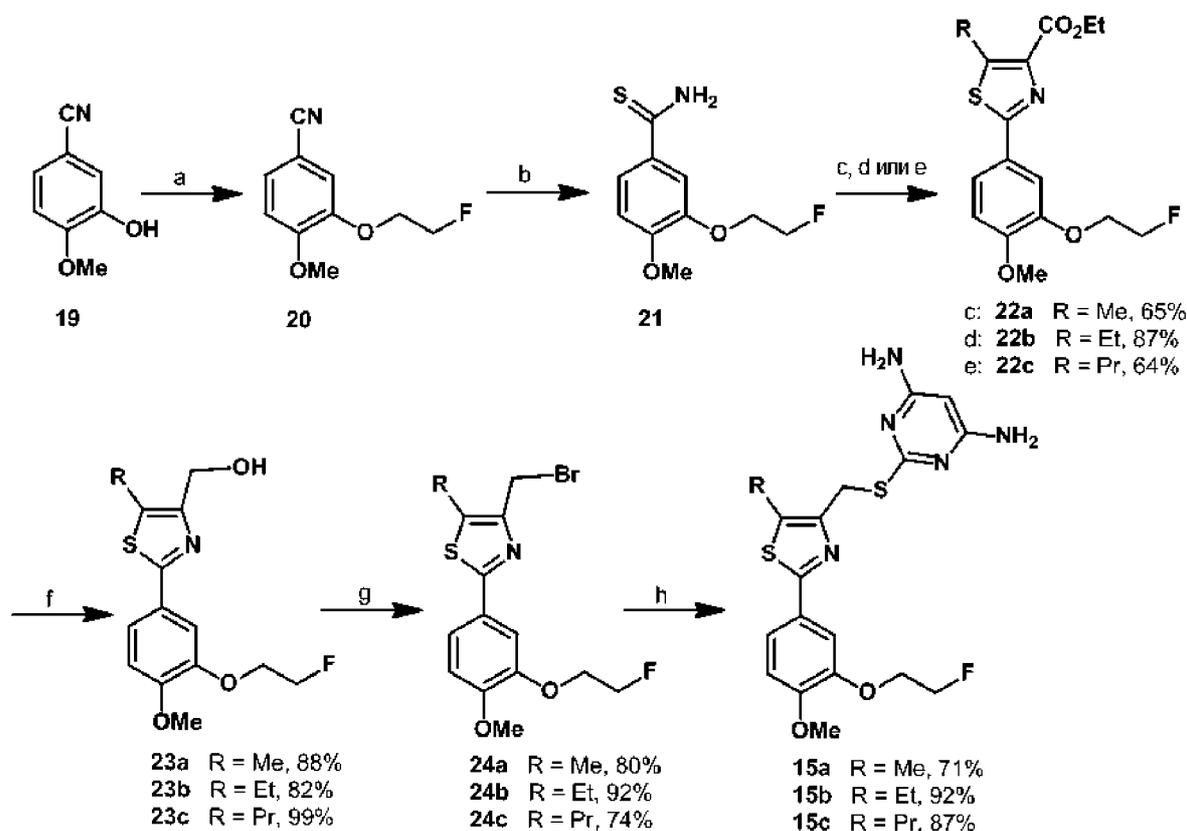
Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	IC <sub>50</sub> (мкМ) L1210 клетки			IC <sub>50</sub> (мкМ) CEM клетки		
				a Y = Me	b Y = Et	c Y = Pr	a Y = Me	b Y = Et	c Y = Pr
<b>15</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	0.035 (= 0.015)	0.030 (= 0.077)	0.003 (= 0.000)	0.018 (= 0.012)	0.007 (= 0.002)	0.003 (± 0.000)
<b>16</b>	F	H	F	0.595 (= 0.163)	0.620 (= 0.170)	0.385 (= 0.262)	0.150 (= 0.099)	0.162 (= 0.019)	0.173 (± 0.157)
<b>17</b>	H	F	H	0.395 (= 0.134)	0.265 (= 0.163)	0.170 (= 0.099)	0.230 (= 0.134)	0.083 (= 0.043)	0.037 (± 0.020)
<b>18</b>	H	H	F	0.255 (= 0.021)	0.510 (= 0.014)	0.175 (= 0.007)	0.092 (= 0.045)	0.011 (= 0.035)	0.031 (± 0.024)

<sup>a</sup> Ингибиторная активность, измеренная путем захвата <sup>3</sup>H-дезокситидина (<sup>3</sup>H-dC) мышинными L1210 клетками и CCRF-CEM человеческими клетками. Сообщаемые значения являются средними ± SD от, по меньшей мере, n = 2 независимых экспериментов.

[0449] Соединения **15a** - **c** были синтезированы в шесть стадий (Схема 4). Коммерчески доступный 3-гидрокси-4-метоксибензонитрил **19** функционализировали путем алкилирования 1-бром-2-фторэтаном в ДМФ с карбонатом цезия как основой, чтобы

получить нитрил **20** с 99 % выходом. Подвержение **20** действию водного раствора сульфида аммония в основных условиях давало тиоамид **21** с прекрасным выходом.<sup>31</sup> Циклизация с образованием тиазольного ядра **15a** - с достигалась за счет конденсации тиоамида **21** с соответствующим этил 3-бром-2-оксоалканоатом<sup>32</sup> в кипящем этаноле.<sup>33</sup> Восстановление полученных в результате соединений диизобутилалюмогидридом давало соответствующие спирты **23a** - **c** с 88 - 99 % выходом. Спирты **23a** - **c** превращали в соответствующие бромиды **24a** - **c** в мягких условиях<sup>34</sup> с 74 - 80 % выходом. В конечном счете, нуклеофильное замещение бромиды 4,6-диамино-2-меркаптопиримидином<sup>35</sup> давало желаемые продукты **15a** - **c** с 71 - 87 % выходом.

Схема 4. Синтез соединений **15a** – **c**<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Реагенты и условия: (a) 1-бром-2-фторэтан, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ДМФ, 99%; (b) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S (20% в H<sub>2</sub>O), пиридин, Et<sub>3</sub>N, количественное; (c) этил 3-бром-2-оксобутаноат, EtOH; (d) этил 3-бром-2-оксопентаноат, EtOH; (e) этил 3-бром-2-оксогексаноат, EtOH; (f) DIBAL-H, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (g) 1,1,1,3,3,3-гексабромацетон, PPh<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN; (h) 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин, NaOH, EtOH.

[0450] Рентгеновский кристаллическая структура соединения **15a**, связанного с человеческим dСК. Рентгеновский кристаллографические исследования соединения **15a**

предпринимали, чтобы получить информацию о его связывания с dСК. Подробно описанный анализ взаимодействий dСК-ингибитор выполняли для данной серии соединений. Короче говоря, кристаллическая структура комплекса dСК:**15a** была определена с 1,9 Å разрешающей способностью (**Фигура 27**). Человеческий dСК, димер из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой ~30 кДа на мономер, может связываться или с АТФ или УТФ как донором фосфорила для катализа; кроме того, dСК может принимать открытую или закрытую конформацию.<sup>36,37,3</sup> В комплексе с **15a**, фермент принимает открытую конформацию. Мы наблюдали две **15a** молекулы в каждом протомере димерного фермента ((**15a-I**) и (**15a-II**), **Фигура 27A**). Обратите внимание, что связывание **15a** с dСК не исключает нуклеотидное связывание (**Фигура 27A**). Параллельная ориентация между **15a-I** и **15a-II** позволяет для оптимально π-π стекинг взаимодействий между фенилом и тиазольными кольцами каждой молекулы.

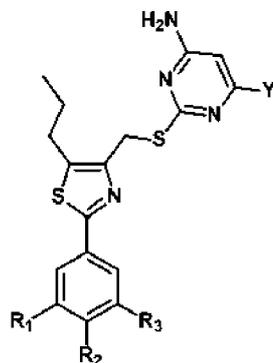
**[0451]** В то время как две молекулы **15a** связываются в активном сайте, оказывается, что **15a-I** образует более ключевые взаимодействия и более короткие расстояния водородных связей, чем у **15a-II** (**Фигура 27B**). Обширная сеть водородной связи, которая существует между пиримидиновым фрагментом **15a-I** и остатками E53, Q97 и D133 в сайт связывания dСК нуклеозида показаны на **Фигуре 27B**. **Фигура 27C** иллюстрирует гидрофобный карман, который существует за счет V55, L82 и F96, вокруг метильной группы соединения **15a**. Данная фигура демонстрирует, что карман будет принимать большие заместители, объясняя повышенную тенденцию в эффективности, полученной для соединений **15b** и **15c**.

**[0452]** Подход Монте-Карло<sup>38</sup> (MC) на основе компьютерного моделирования, используя способ пертурбации свободной энергии (FER)<sup>39,40</sup>, использовали для дальнейшего исследования ингибиторных эффектов удлинения алкильной цепи в 5-положении тиазола. FER позволяет рассчитать разность в энергии связывания двух молекул. Пертурбация молекулы **A** в молекулу **B** в комплексе с белком [ $\Delta G_{\text{белок}}(A \rightarrow B)$ ] и в одном только растворе [ $\Delta G_{\text{вода}}(A \rightarrow B)$ ] является частью полного термодинамического цикла (**Фигура 3A**). Так как сумма всех компонентов в таком цикле должна быть равна нулю, разность энергии связывания может рассчитываться как разность свободных энергий:

$$\Delta\Delta G_{\text{связывание}} = \Delta G_{\text{связывание}}(B) - \Delta G_{\text{связывание}}(A) = \Delta G_{\text{белок}}(A \rightarrow B) - \Delta G_{\text{вода}}(A \rightarrow B)$$

[0453] Модели структур **15b** и **15c** (Фигура 28B) каждая в мономерном комплексе с dCK и в растворе самостоятельно уравнивали, используя MC. Уравновешенную структуру **15c** впоследствии пертурбировали в структуру **15b** (“сжимаемая” пропиловую цепь в этил) и наоборот (“наращиваемая” этильную цепь в пропиловую), используя FEP. Данные расчеты выполняли используя пакет программного обеспечения MCPRO 2,0<sup>41</sup>. Изменения свободной энергии для данных пертурбаций иллюстрируются на Фигуре 3C. Усреднение  $\Delta\Delta G_{\text{связывание}}$ , полученное из двух имитаций указывает на то, что пропиловая цепь **15c** сообщает на 1,210 ккал/моль больше благоприятной свободной энергии связывания по сравнению с этильной цепью **15b**; этот благоприятный эффект обусловлен десольватацией. Изменение свободной энергии при расширении алкильной цепи является неблагоприятным как в комплексе с белком, так и только с водой (положительный  $\Delta G$  для удлинения цепи, отрицательный  $\Delta G$  для укорочения цепи); однако, величина неблагоприятного  $\Delta G$  больше в растворителе. Тот факт, что это создает общую благоприятную  $\Delta\Delta G$  связывания позволяет предположить, что пропиловая цепь лучше может исключить вода из внутренней полости белка, что позволяет большую ассоциацию между белком и ингибитором.

[0454] Основанные на направленности эффективности в Таблице 6 и наличие гидрофобного кармана вокруг 5-положения тиазольного кольца **15a**, кроме того, соединения в SAR были сделаны с пропиловой цепью, введенной в то положение, которое повышает взаимодействия между dCK ферментным карманом и ингибиторами. Атом фтора, находящийся на конце этокси боковой цепи был замещен на гидроксильную или сульфонамидную группу, с целью улучшения свойства растворимости молекулы, а также возможных взаимодействий водородных связей, которые могут существовать в активном сайте. К тому же, поскольку ингибиторная активность в L1210 и CCRF-CEM клетках демонстрировали ту же тенденцию в эффективности, SAR для всех впоследствии синтезированных соединений исследовали только в клетках CCRF-CEM. Результаты приведены в Таблице 7.

Таблица 7. *In vitro* биологические данные в СЕМ клетках для соединений 25- 37<sup>a</sup>

Соединение	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Y	IC <sub>50</sub> (нМ) СЕМ клетки
25	H	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NH <sub>2</sub>	2.45 (± 0.778)
26	H	F	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NH <sub>2</sub>	1.07 (± 0.230)
27	F	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NH <sub>2</sub>	2.83 (± 1.628)
28	H	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	11.58 (± 3.353)
29	F	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	8.01 (± 0.230)
30	H	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NH <sub>2</sub>	2.59 (± 1.146)
31	H	OCH <sub>3</sub>	OH	NH <sub>2</sub>	18.62 <sup>b</sup>
32	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NH <sub>2</sub>	1.55 (± 0.354)
33	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NH <sub>2</sub>	1.15 (± 0.762)
34	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	2.90 (± 0.300)
35	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )OH	NH <sub>2</sub>	2.85 (± 0.071)
36	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	NH <sub>2</sub>	1.44 (± 0.538)
37	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHSO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	4.89 (± 2.014)

<sup>a</sup> Ингибиторная активность, измеренная путем захвата <sup>3</sup>H-дезокситидина (<sup>3</sup>H-dC) ССRF-СЕМ человеческими клетками. Сообщаемые значения являются средними ± SD от, по меньшей мере, n = 2 независимых экспериментов. <sup>b</sup>Значение сообщалось для n = 1.

**[0455]** Соединения **25 - 27** показали отличную (1 - 2 нМ) эффективность против CCRF-СЕМ клеток (**Таблица 7**). Замещение в конце цепи гидроксила на метилсульфонамид в результате приводит к уменьшению ингибиторной активности приблизительно в 3-раза (сравнение **27** с **29**) или в 5-раз (сравнение **25** с **28**). Первоначальный SAR в **Таблице 5** показывал, что присутствие алкокси заместителя в пара-положении привело к усилению ингибиторной активности; таким образом, метокси группу переводили в пара-положение. Как и следовало ожидать, удаление этокси боковой цепи (например, соединение **31**) в результате приводило к значительно более низкой ингибиторной активности, подкрепляя данные, наблюдаемые для соединений **16 - 18** (**Таблица 6**). Присутствие метокси фрагмент в пара-положении, в дополнение к гидроксилэтоксид боковой цепи в мета-положении, создавало соединение **33**, которое имеет ингибиторную эффективность 1 нМ. К нашему удивлению, удаление одной из аминогрупп из пиримидинового кольца привело к всего лишь уменьшению в 2,5-раза ингибиторной активности (сравнение **33** с **34**). Первоначально мы наблюдали, что удаление обеих аминогрупп из пиримидинового кольца в результате привело к полной потере ингибиторной активности (соединения **6** и **7**, **Фигура 26**); однако, присутствие одной аминогруппы может обеспечить подходящие ключевые взаимодействия водородных связей, чтобы ингибировать фермент. Соединение **32**, которое содержит боковую цепь, которая расширяется на один атом углерода, получая гидроксилпропокси группу, также было синтезировано. Однако, данная модификация в результате приводила к незначительно сниженной ингибиторной активности по сравнению с гидроксилэтоксид группой. В то время как соединение **33** было эффективным соединением в культуре клеток, присутствие первичной гидроксильной группы в молекуле вызывало затруднения метаболической подверженности как следствие потенциального окисления или глюкуронидирования.<sup>42</sup> Таким образом, соединения **35 - 37** были синтезированы, чтобы уменьшить возможность метаболической деградации **33**. Восемь из данных соединений в **Таблице 7**, чьи значения IC<sub>50</sub> были ниже, чем **15a** и чьи структурные свойства дают основание предполагать, что они будут иметь лучшую эффективность *in vivo*, были выбраны для дальнейшего исследования.

**[0456]** Для того, чтобы подтвердить то, что значения основанные на клетках отражают эффективность соединений мы также определяли Ki<sup>app</sup> значения для выбора соединений с использованием кинетических анализов устойчивого состояния. Анализ на основе клеток показал, что соединения **15a** было в 6 - 12 раз (в зависимости от клеточной линии, использованной для анализа) менее эффективным, чем соединение **15c** (**Таблица 6**).

Соответственно, данные для установившегося режима показали в 6-раз более высокое значение  $K_i^{app}$  для соединения **15a** (Таблица 8). Аналогичным образом, низкую наномолярную  $IC_{50}$ , наблюдаемую в СЕМ клетках для соединений **36** и **37** (Таблица 7), воспроизводились в установившихся кинетиках, полученных значений  $K_i^{app}$  для данных соединений (Таблица 8). Таким образом, мы приходим к выводу, что наш анализ на основе клеток обеспечивают нас относительно точными данными о силе взаимодействий между соединениями и dСК.

**Таблица 8.** Установившиеся кинетики выбранных ингибиторов dСК

Соединение	$K_i^{app}$ (нМ)	Ошибка (нМ)	$R^2$
<b>15a</b> *	9.5	2.3	0.974
<b>15c</b> *	1.5	0.3	0.998
<b>36</b>	0.8	0.7	0.982
<b>37</b>	0.5	0.5	0.988

\*Данные от Nomme *et al.*

[0457] Оценка *in vivo* ингибирования активности dСК с помощью нового анализа PET PD. Аналог нуклеозидного PET зонда  $^{18}F$ -L-FAC представляет собой субстрат с высокой аффинностью для dСК, которые могут быть использованы для неинвазивной оценки ферментной активности dСК *in vivo*.<sup>27</sup> Схематическое изображение механизма, по которому  $^{18}F$ -L-FAC накапливается в клетках dСК-специфическим способом показано на Фигуре 4А. Мы полагали, что  $^{18}F$ -L-FAC PET может быть использован, чтобы быстро идентифицировать наиболее эффективные ингибиторы dСК на основе их эффективности при ингибировании накопления  $^{18}F$ -меченого dСК субстрата PET меткой в различных тканях. Для анализа *in vivo* PET PD мы выбрали ингибиторы dСК, которые демонстрировали 1 – 12 нМ ингибиторную активность в анализе захвата клеточной культурой  $^3H$ -dC (Таблица 3). Мышей обрабатывали одной дозой (50 мг/кг) данного ингибитора dСК, введенного путем внутрибрюшинной инъекции. Контрольные мыши получали инъекции носителя (40 % каптизол в воде). Через четыре часа, обработанным мышам внутривенно вводили  $^{18}F$ -L-FAC; через один час после инъекции зонда, мыши были обследованы с помощью mPET/CT. Считывание данных PET PD анализа показали снижение накопления  $^{18}F$ -L-FAC в dСК-положительных тканях ингибитора dСК против

обработанных носителем мышей. Ранее мы показали, что  $^{18}\text{F-L-FAC}$  накапливается dСК-зависимым способом в различных тканях, таких как тимус, селезенка, костный мозг и печень.<sup>27</sup> Накопление в мочевом пузыре является результатом неферментативного почечного клиренса от неразложившиеся зонда. Поскольку воспроизводимость удержания в dСК-зависимой ткани  $^{18}\text{F-L-FAC}$  была наиболее соответствующей в печени<sup>27</sup>, мы решили дать количественную оценку  $^{18}\text{F-L-FAC}$  удержанию в печени для того, чтобы сравнить эффективность *in vivo* различных ингибиторов dСК. Оптимальные условия для анализа PET PD определяли путем проведения исследования курса эскалации дозы и времени, используя соединение **33**.

**[0458]** Результаты сканирований  $^{18}\text{F-L-FAC}$  mPET/CT приведены на **Фигуре 29**. Аксиальные PET изображения  $^{18}\text{F-L-FAC}$  сканирований печени для мышей, обработанных или носителем или соединениями **15a**, **36** или **37** показаны на **Фигуре 29В**. **Фигура 29С** иллюстрирует захват  $^{18}\text{F-L-FAC}$  в печени мышей, обработанных ингибиторами dСК. Эффективные соединения индуцировали большее снижение захвата  $^{18}\text{F-L-FAC}$  по сравнению с обработкой носителем, как результат их большего ингибирования dСК-опосредованного фосфорилирования их  $^{18}\text{F}$ -меченного субстрата. Обращаем внимание на снижение приблизительно на 30 %  $^{18}\text{F-L-FAC}$  сигнала по сравнению с контролем носителя, индуцированное соединениями **28**, **29**, **36** и **37**, что указывает на их высокую *in vivo* эффективность по сравнению с другими кандидатами в ингибиторы dСК. Кроме того, соединения **30** и **32** показывают снижение приблизительно на 20 % в захвате зонда. Соединение **33**, эффективные ингибиторы dСК в анализе клеточной культуры (**Таблица 7**), показало эффективность пула *in vivo* в  $^{18}\text{F-L-FAC}$  печени PET анализе, предположительно из-за его плохих PK свойств. Как и предполагалось, замещение гидроксильной группы в конце этокси цепи (например, соединение **33**) для метаболически стабильного метилсульфонамида (соединения **28**, **29** и **37**) или затруднения гидроксильной группы (соединение **36**) оказалось выгодным для эффективности *in vivo*. Соединения **36** и **37** имеют самые низкие значения  $\text{IC}_{50}$  среди всех эффективных соединений и были выбраны для дальнейшего изучения.

**[0459]** Далее мы определили эффективность соединения **36** при ингибировании активности dСК в опухолевых тканях *in vivo*. Мышей, несущих CCRF-CEM ксенотрансплантатную опухоль, обрабатывали соединением **36** за четыре часа до инъекции  $^{18}\text{F-L-FAC}$  (**Фигура 29D**). Через час после инъекции  $^{18}\text{F-L-FAC}$  мыши были обследованы с помощью mPET/CT. Удерживание  $^{18}\text{F-L-FAC}$  в ксенотрансплантатной

опухоли от мышей, обработанных соединением **36** снижалось примерно на 30 % по сравнению с удерживанием  $^{18}\text{F}$ -L-FAC в опухолях от обработанных носителем мышей (**Фигура 29D**). В дополнение анализа PET, фармакокинетики соединения **36** определяли с использованием стандартных аналитических методов и приблизительные значения приведены на **Фигуре 30**.

[0460] Рентгеновские кристаллографические исследования соединения **36** начинали, чтобы получить информацию о его связывании с dCK. Кристаллическая структура комплекса dCK:**36** была установлена с 1,94 Å разрешающей способностью (**Фигура 31** и **Таблица 9**). Подобно нашим наблюдениям для соединения **15a** (**Фигура 27**), в случае **36**, фермент также принимает открытую конформацию. Мы наблюдали одну молекулу **36** в каждом протомере димерного фермента (**Фигура 31A**). Это контрастирует с наблюдением двух молекул, связанных с активным сайтом, когда заместитель в 5-положении меньше, чем пропил, присутствующий в **36** (**Фигура 27**). Обратите внимание, что связывание **36** с dCK не исключает нуклеотидное связывание (**Фигура 31A**). Специфические взаимодействия dCK:**36** показаны на **Фигуре 31B**. Они включают обширную сеть водородных связей между пиримидиновым фрагментом **36** и остатками E53, Q97 и D133 в dCK нуклеозидном сайте связывания, а также несколько гидрофобных взаимодействий.

[0461] Сообщается идентификация эффективных низкомолекулярных ингибиторов человеческого dCK, которые демонстрируют *in vivo* нацеленное ингибирование. Оптимизация ингибиторной активности достигалась за счет расширения алкильной цепи от 5-положения тиазольного кольца. *in vivo* эффективность была улучшена путем манипулирования этокси боковой цепи, присутствующей в мета-положении фенильного кольца. Полезность PET в качестве мощного инструмента для неинвазивного измерения нацеленного ингибирования и, следовательно, как меры отсутствия нацеленного ингибирования (скорее всего из-за метаболизма субстрата *in vivo*), также представлены. Хотя основные клинические применения PET являются в первую очередь для центральной нервной системы (ЦНС) и диагностики/терапии на основе онкологии, PET играет все более важную роль в разработке лекарственных средств, принимая во внимание способность этой молекулярной платформы визуализации для решения ключевых проблем, которые включают оценку биораспределения, абсорбции, нацеленной аффинности, связывания с плазмой, метаболизма, и дозирования.<sup>43</sup> Здесь мы использовали радиоактивную метку  $^{18}\text{F}$ -L-FAC как PET PD биомаркер для сравнения эффективностей *in vivo* кандидатов в ингибиторы dCK, впервые идентифицированы и охарактеризованы

эффективностью в анализе клеточных культур. Кроме того, мы использовали PET для получения оценок *in vivo* нацеленного ингибирования в CCRF-CEM ксенотрансплантатных мышинных моделях одним из наших наиболее перспективных соединений, **36**. Способность другого многообещающего соединения, **37**, чтобы вызвать значительный фармакологический ответ против опухолей CCRF-CEM с минимальной токсичностью по отношению к нормальным тканям, оценивалась нашей группой и описана в отдельной публикации. Дальнейшая оптимизация предложений по улучшению свойств РК и растворимости наших наилучших ингибиторов dCK будут рассмотрены в последующих исследованиях. Кроме того, присутствие фтора в ароматическом кольце of одного из самых перспективных ингибиторов dCK, **29**, делает его доступным для введения  $^{18}\text{F}$  радиоактивной метки. Синтез низкомолекулярного ингибитора dCK с  $^{18}\text{F}$  радиоактивным изотопом может генерировать позитронно-эмиссионной версию терапевтического кандидата, который может быть обнаружен и количественно определен неинвазивно по всему телу живых индивидуумов за счет PET визуализации. Эта работа будет предметом будущего общения.

Таблица 9. Сбор данных и статистических уточнений

Комплекс	<b>36 + UDP</b>
PDB коды	4L5B
<b>Статистика сбора данных</b>	
Источник рентгеновского излучения и детектор	LS-CAT ID-G MARCCD 300
Длина волны (Å)	0.97856
Температура (K)	100
Разрешающая способность <sup>a</sup> (Å)	1.94 (1.94 – 2.05)
Количество рефлексов	
Наблюдаемое	206005
Уникальное	40954
Полнота (%)	99.2 (98.1)
R <sub>sym</sub> (%)	4.5 (71.8)
Среднее I/s(I)	17.05 (2.05)
Пространственная группа	P 4 <sub>1</sub>
Элементарная ячейка (Å):	
a = b	68.67
c	120.02
<b>Статистика уточнений</b>	
Уточняющая программа	REFMAC5
Доля удвоений	0.5
R <sub>крис.</sub> (%)	18.8
R <sub>св.</sub> (%)	23.3
Диапазон разрешающей способности (Å) 30 – 1.94	
Молекулы белка на ат.ед.	2
Число атомов:	
Белок (белА, белВ)	1932, 1925
Ингибитор	32 x 2
UDP	25 x 2
Вода	75
R.m.s. отклонение от идеального:	
Длина связи (Å)	0.011
Углы связи (°)	1.647
Средние B-факторы (Å <sup>2</sup> )/цепь	
Белок (белА, белВ)	47.1, 47.3
Ингибитор (белА, белВ)	45.1, 43.4
UDP (белА, белВ)	47.8, 44.7
Молекулы воды	42.9
Карта Рамачандрана (%):	
наиболее предпочтительные области	89.1
Дополнительно дозволённые области	10.5
Обычно дозволённые области	0.5
недозволённые области	0.0

<sup>a</sup> Последняя оболочка в круглых скобках

[0462] Скрининг с высокой пропускной способностью. Рекомбинантный человеческий dCK концентрацией 1 мкМ инкубировали с 10 мкМ лекарственного средства, 10 мкМ dC и 0,5 мкМ АТФ в 50 мМ Трис (pH 7,6), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ DTT. Реакционную смесь

инкубировали при 37 °С в течение 4 часов перед добавлением CellTiter-Glo (Promega): Коротко, 40 мкл dCK фермента распределяли в 384 лунковые планшеты (Greiner, Bahlingen, Germany), используя многоканальный 384 (Thermo, Turku, Finland) концентрацией 12,5 мкг/мл; соединения добавляли, используя Beckman-Coulter Biomek FX (Beckman Coulter, Brea, CA), оснащенную 500 нл обычным инструментом с иглой (V&P Scientific, San Diego, CA). Столбцы 1, 2, 23 и 24 получали только ДМСО вместо каких-либо лекарственных средств. Кроме того, ни один dCK не добавляли в столбцы 23 и 24, поскольку эти колонны служили в качестве дополнительного контроля (см. ниже). После 30 мин инкубирования при 37 °С, dC и АТФ добавляли до конечных концентраций 10 мкМ и 0,5 мкМ, соответственно для столбцов 1-22, используя мультипипетку объемом 10 мкл. Для столбцов 23 и 24 использовали следующие контроли: 10 мкл 2,5 мкМ раствора АТФ, содержащий следующие дополнительные контроли, добавляли: для лунок A-D23, 1 мкМ дЦТФ, для лунок E-H23 10 мкМ дЦТФ, для лунок I-L23 10 мкМ L-FAC, для лунок F-P23: 10 мкМ FAC, для лунок A-D24: 0,5 мкМ АТФ стандарт, для лунок E-H24: 0,1 мкМ АТФ стандарт, для лунок I-L24 1 мкМ DCK только и для лунок F-P24 10 мкМ УТФ добавляли, соответственно. Данные контроли были включены в каждый планшет, чтобы исключить неисправности оборудования. За этим последовало 4-часовое инкубирование при 37 °С и добавление 25 мкл клеточного титра glo реагента (Promega, Fitchburg, WI) с помощью мультипипетки с последующим чтением на планшет-ридере Acquest (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Используемые библиотеки были пользовательскими наборами соединений из соединения производителей Asinex (Winston-Salem, NC) и Enamine (Monmouth Jct., NJ). Эти наборы состояли из соединений, широко выбранных за подобием лекарственного средства по правилу Липинский пяти, вращающихся связей и максимального разнообразия с использованием алгоритмов пользовательской кластеризации.

**[0463]** Химия. *Общие процедуры.* Если не указано иное, реакции проводили в высушенной в сушильном шкафу стеклянной посуде в атмосфере азота, используя коммерчески доступные безводные растворители. Растворители, используемые для экстракции и хроматографии не были безводными. 4,6-Диамино-2-меркаптопиримидин получали при высушивании гидрата при динамическом вакууме при 110 °С в течение 20 часов. Все другие реагенты, которые получали из коммерческих источников, были реагентами качества и использовали без дополнительной очистки, если не указано иное. Реакционные смеси и хроматографические фракции анализировали, используя

тонкослойную хроматографию (ТСХ), используя Merck предварительно покрытые силикагелем 60 F<sub>254</sub> стеклянные пластины (250 мкм). Визуализацию осуществляли, используя ультрафиолетовый свет, ванилиновое окрашивание, окрашивание перманганатом, или окрашивание *n*-анисовым альдегидом. Флеш-колоночную хроматографию выполняли, используя E. Merck силикагель 60 (230-400 меш) с помощью сжатого воздуха. <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектры регистрировали на ARX500 (500 МГц) или Avance500 (500 МГц) спектрометрах. Химические сдвиги регистрировали в миллионных долях (м.д.,  $\delta$ ), используя пик остаточного растворителя как стандарт. ДМСО-d<sub>6</sub> ( $\delta$  2,50 м.д. для <sup>1</sup>H;  $\delta$  39,5 м.д. для <sup>13</sup>C) использовали как растворитель и эталонные стандарты, если не указано иное. Константы взаимодействия, *J*, представлены в Герцах (Гц) резонансные характеристики сообщаются с нотациями, как следующие: ш (широкий), с (синглет), д (дублет), т (триплет), кв (квартет), и м (мультиплет). Данные электроспрей масс-спектрометрии собирали с Waters LCT Premier XE времяпролетного устройства для измерения размера частиц контролировали, используя MassLynx 4.1 программное обеспечение. Образцы растворяли в метаноле и вводили, используя непосредственно петлевой инжектор от Waters Acquity UPLC в Multi-Mode источнике ионизации. Чистота всех конечных соединений, как определено, составляла >95 %. Аналитический анализ ВЭЖХ выполняли в Knauer Smartline ВЭЖХ системе с Phenomenex колонкой с обращенной фазой Luna (5 мкм, 4,6 × 250 мм) с встроенным УФ детектором Knauer (254 нм). Подвижная фаза: А: 0,1 % ТФУ в Н<sub>2</sub>О, В: 0,1 % ТФУ в MeCN. Градиент элюента определяют для каждого описанного соединения в дополнительной информации. Все хроматограммы собирали с помощью GinaStar (Raytest USA, Inc.; Wilmington, NC, USA) аналога цифрового преобразователя и GinaStar программного обеспечения (Raytest USA, Inc.).

**[0464] Общий способ синтеза соединений **15a** – с. **3-(2-фторэтокси)-4-****

**метоксибензонитрил (20)**. К раствору 3-гидрокси-4метоксибензонитрила **19** (3,0 г, 20,1 ммоль) в ДМФ (100 мл) добавляли Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10,5 г, 32,2 ммоль) и 1-бром-2-фторэтан (5,1 г, 40,2 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 50 °С. После концентрирования, чтобы удалить остаточный растворитель, полученный в результате остаток промывали насыщенным соевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали водой три раза, сушили над безводным MgSO<sub>4</sub> и концентрировали *в вакууме* получая сырое вещество **20** (3,91 г, 20,03 ммоль, 99 %) в виде твердого вещества кремового цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7,28 (дд, *J* = 8,5, 2,0 Гц, 1H), 7,10 (д, *J* = 2,0

Гц, 1Н), 6,90 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1Н), 4,83 – 4,81 (м, 1Н), 4,73 – 4,71 (м, 1Н), 4,28 – 4,26 (м, 1Н), 4,23 – 4,21 (м, 1Н), 3,89 (с, 3Н);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 153,6, 148,1, 127,3, 119,1, 116,5, 111,9, 103,8, 82,3 (д,  $J_{\text{CF}} = 170,5$  Гц), 68,7 (д,  $J_{\text{CF}} = 20,3$  Гц), 56,1.

**[0465] 3-(2-фторэтокси)-4-метоксибензотиоамид (21).** К смеси **20** (3,86 г, 19,8 ммоль) в пиридине (41 мл) и триэтилаmine (3 мл) добавляли раствор сульфида аммония (20 % масс. в  $\text{H}_2\text{O}$ , 13,52 мл, 39,6 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 60 °С. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель. Полученный в результате остаток промывали насыщенным соевым раствором и экстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили над безводным  $\text{MgSO}_4$  и концентрировали в вакууме, получая **21** (4,5 г, 19,8 ммоль, количественный) в виде желто-оранжевого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ацетон- $d_6$ )  $\delta$ : 8,81 (ш с, 1Н), 8,74 (ш с, 1Н), 7,73 (с, 1Н), 7,72 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1Н), 7,00 (д,  $J = 8,0$  Гц, 1Н), 4,79 (дт,  $J = 48,0, 4,0$  Гц, 2Н), 4,32 (дт,  $J = 29,5, 4,0$  Гц, 2Н), 3,89 (с, 3Н);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, ацетон- $d_6$ )  $\delta$ : 200,4, 152,9, 147,2, 131,8, 121,5, 113,6, 110,8, 82,7 (д,  $J_{\text{CF}} = 167,3$  Гц), 68,5 (д,  $J_{\text{CF}} = 19,6$  Гц), 55,4.

**[0466] Этил 2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-карбоксилат (22a).** Смесь тиоамида **21** (1,50 г, 6,5 ммоль) и этил 3-бром-2-оксобутаноата (2,72 г, 13,0 ммоль) в этаноле (32 мл) перемешивали в условиях кипячения в течение 2,5 ч. Полученную в результате смесь охлаждали и концентрировали в вакууме, чтобы удалить остаточный растворитель. Сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (10:3 гексаны:этилацетат), получая желаемое тиазольное промежуточное соединение **22a** (1,45 г, 4,3 ммоль, 65 % ) в виде светло-коричневого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$ : 7,40 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1Н), 7,37 (д,  $J = 2,0$  Гц, 1Н), 7,04 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1Н), 4,72 (дт,  $J = 48,0, 4,0$  Гц, 2Н), 4,31 – 4,22 (м, 2Н), 4,28 (кв,  $J = 7,0$  Гц, 2Н), 3,81 (с, 3Н), 2,67 (с, 3Н), 1,28 (т,  $J = 7,0$  Гц, 3Н);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$ : 162,9, 162,1, 151,4, 148,2, 143,9, 141,9, 125,5, 120,5, 112,6, 110,8, 83,1 (д,  $J_{\text{CF}} = 165,9$  Гц), 68,3 (д,  $J_{\text{CF}} = 19,0$  Гц), 60,8, 56,0, 14,5, 13,3.

**[0467] (2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)метанол (23a).** К перемешиваемому раствору промежуточного соединения **22a** (860 мг, 2,5 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 мл), охлажденного до 0 °С, медленно добавляли диизобутилалюмогидрид (1,0М в ТГФ, 10 ммоль, 10 мл). Реакционной смеси давали нагреться до 23 °С и перемешивали в течение 1 ч. Смесь охлаждали до 0 °С и медленно гасили насыщенным водным раствором тартрата натрия-калия. Мутный раствор перемешивали в течение 1 ч при 23 °С пока

раствор не стал снова прозрачным. Полученный в результате раствор экстрагировали этилацетатом, промывали насыщенным соевым раствором, сушили над безводным сульфатом магния и концентрировали *в вакууме*, получая желаемый спирт **23a** (654 мг, 2,2 ммоль, 88 %) в виде бледно-желтого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 7,39 (д,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 7,36 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1H), 7,02 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 5,04 (т,  $J = 5,5$  Гц, 1H), 4,73 (дт,  $J = 48,0, 3,5$  Гц, 2H), 4,46 (д,  $J = 5,5$  Гц, 2H), 4,25 (дт,  $J = 30,0, 3,5$  Гц, 2H), 3,79 (с, 3H), 2,41 (с, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 162,7, 153,2, 150,8, 148,2, 129,5, 126,5, 119,8, 112,5, 110,4, 83,1 (д,  $J_{\text{CF}} = 165,9$  Гц), 68,4 (д,  $J_{\text{CF}} = 18,5$  Гц), 57,3, 55,9, 11,2.

**[0468] 4-(бромметил)-2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол (24a).** К раствору **23a** (1,90 г, 6,4 ммоль) в ацетонитриле (30 мл) добавляли  $\text{PPh}_3$  (2,5 г, 9,6 ммоль), затем гексабромацетон (1,70 г, 3,2 ммоль) при 23 °С. Смесь перемешивали в течение 1 ч при 40 °С когда, по ТСХ анализу, весь исходный материал израсходовался. Растворитель удаляли в вакууме, и сырой остаток чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (10:3 гексаны:этилацетат), получая желаемый бромид **24a** (1,84 г, 5,1 ммоль, 80 %) в виде светло-коричневого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,50 (д,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 7,40 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1H), 6,88 (д,  $J = 8,0$  Гц, 1H), 4,81 (дт,  $J = 47,0, 4,0$  Гц, 2H), 4,59 (с, 2H), 4,36 (дт,  $J = 27,5, 4,0$  Гц, 2H), 3,90 (с, 3H), 2,46 (с, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164,1, 151,2, 148,1, 148,0, 131,7, 126,4, 120,4, 111,6, 111,5, 82,4 (д,  $J_{\text{CF}} = 169,9$  Гц), 68,4 (д,  $J_{\text{CF}} = 20,5$  Гц), 55,9, 25,8, 11,4.

**[0469] 2-(((2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-метилтиазол-4-ил)метил)тио)пиримидин-4,6-диамин (15a).** 4,6-диамино-2-меркаптопиримидин (336 мг, 2,36 ммоль) и  $\text{NaOH}$  (94 мг, 2,36 ммоль) перемешивали в этаноле (20 мл) в течение 10 мин при 23 °С. К реакционной смеси добавляли раствор бромида **24a** (710 мг, 1,97 ммоль) в горячем этаноле (16 мл) и полученную в результате смесь перемешивали в течение 3 ч при 70 °С. Раствор охлаждали, концентрировали в вакууме и чистили, используя флеш-колоночную хроматографию на силикагеле (100:5 дихлорметан:метанол), получая желаемый продукт **15a** (590 мг, 1,40 ммоль, 71 %) в виде бледно-желтого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 7,36 (с, 1H), 7,34 (д,  $J = 8,0$  Гц, 1H), 7,02 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 6,09 (ш с, 4H), 5,12 (с, 1H), 4,72 (дт,  $J = 48,0, 3,5$  Гц, 2H), 4,32 (с, 2H), 4,25 (дт,  $J = 30,5, 3,5$  Гц, 2H), 3,78 (с, 3H), 2,43 (с, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 168,3, 163,9 (2), 163,3, 150,9, 149,5, 148,3, 129,1, 126,4, 119,9, 112,7, 110,5, 83,2 (д,  $J_{\text{CF}} = 165,9$  Гц), 79,5, 68,5 (д,  $J_{\text{CF}} = 18,7$  Гц), 56,1, 27,9, 11,7; HRMS-ESI ( $m/z$ )  $[\text{M} + \text{H}]^+$  расщ. для  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}_2$  Н, 422,1121; найдено 422,1136.

**[0470] 2-(((5-этил-2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)тиазол-4-ил)метил)тио)пиримидин-4,6-диамин (15b).**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 7,37 (дд,  $J = 8,0, 2,0$  Гц, 1H), 7,36 (с, 1H), 7,02 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 6,13 (ш с, 4H), 5,13 (с, 1H), 4,72 (дт,  $J = 47,5, 4,0$  Гц, 2H), 4,34 (с, 1H), 4,25 (дт,  $J = 30,5, 4,0$  Гц, 2H), 3,79 (с, 3H), 2,87 (кв,  $J = 7,5$  Гц, 2H), 1,17 (т,  $J = 7,5$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 168,2, 163,8 (2), 163,5, 151,0, 148,4, 148,3, 136,9, 126,5, 119,9, 112,7, 110,5, 83,3 (д,  $J_{\text{CF}} = 165,9$  Гц), 79,5, 68,5 (д,  $J_{\text{CF}} = 18,8$  Гц), 56,1, 28,0, 19,9, 17,1; HRMS-ESI ( $m/z$ ) [ $M + H$ ] $^+$  расщ. для  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}_2$  Н, 436,1277; найдено 436,1263.

**[0471] 2-(((2-(3-(2-фторэтокси)-4-метоксифенил)-5-пропилтиазол-4-ил)метил)тио)пиримидин-4,6-диамин (15c).**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ацетон- $d_6$ )  $\delta$ : 7,53 (д,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 7,46 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1H), 7,03 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 5,63 (ш с, 4H), 5,38 (с, 1H), 4,80 (дт,  $J = 48,0, 4,0$  Гц, 2H), 4,45 (с, 2H), 4,34 (дт,  $J = 29,5, 4,0$  Гц, 2H), 3,87 (с, 3H), 2,91 (т,  $J = 7,5$  Гц, 1H), 1,66 (кв. т,  $J = 7,5, 7,5$  Гц, 2H), 0,97 (т,  $J = 7,5$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, ацетон- $d_6$ )  $\delta$ : 169,2, 164,0 (2), 163,9, 163,6, 151,4, 149,0, 148,5, 134,6, 126,9, 119,8, 112,1, 111,1, 82,8 (д,  $J_{\text{CF}} = 167,5$  Гц), 79,5, 68,6 (д,  $J_{\text{CF}} = 19,5$  Гц), 55,3, 28,1, 25,2, 13,0; HRMS-ESI ( $m/z$ ) [ $M + H$ ] $^+$  расщ. для  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{FN}_5\text{O}_2\text{S}_2$  Н, 450,1434; найдено 450,1432.

**[0472] 1-(5-(4-(((4,6-диаминопиримидин-2-ил)тио)метил)-5-пропилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)-2-метилпропан-2-ол (36).**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, MeOD)  $\delta$ : 7,51 (д,  $J = 2,0$  Гц, 1H), 7,39 (дд,  $J = 8,5, 2,0$  Гц, 1H), 7,00 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 5,48 (с, 1H), 5,32 (с, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,89 (с, 3H), 3,86 (с, 2H), 2,88 (т,  $J = 7,5$  Гц, 2H), 1,67 (кв т,  $J = 7,5, 7,5$  Гц, 2H), 1,33 (с, 6H), 0,98 (т,  $J = 7,5$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, MeOD)  $\delta$ : 168,8, 165,2, 163,8 (2), 151,2, 148,9, 148,0, 135,4, 126,4, 119,7, 111,8, 110,7, 79,2, 77,0, 69,6, 55,2, 48,4, 27,9, 27,8, 25,0, 24,9, 12,6; HRMS-ESI ( $m/z$ ) [ $M + H$ ] $^+$  расщ. для  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}_2$  Н, 476,1790; найдено 476,1772.

**[0473] N-(2-(5-(4-(((4,6-диаминопиримидин-2-ил)тио)метил)-5-пропилтиазол-2-ил)-2-метоксифенокси)этил)метансульфонамид (37).**  $^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 7,41 (дд,  $J = 7,5, 2,0$  Гц, 1H), 7,39 (с, 1H), 7,25 (т,  $J = 6,0$  Гц, 1H), 7,05 (д,  $J = 8,5$  Гц, 1H), 6,13 (ш с, 4H), 5,15 (с, 1H), 4,39 (с, 2H), 4,07 (т,  $J = 5,5$  Гц, 2H), 3,80 (с, 3H), 3,36 (дт,  $J = 5,5, 5,5$  Гц, 2H), 3,15 (д,  $J = 5,5$  Гц, 1H), 2,98 (с, 3H), 2,84 (т,  $J = 7,5$  Гц, 2H), 1,58 (кв т,  $J = 7,5, 7,5$  Гц, 2H), 0,91 (т,  $J = 7,5$  Гц, 3H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 168,3, 163,9 (2), 163,7, 151,1, 149,1, 148,3, 135,0, 126,5, 119,9, 112,7, 110,6, 79,5, 68,3, 60,2, 42,4, 31,2, 28,2, 28,0,

25,4, 13,9; HRMS-ESI ( $m/z$ )  $[M + H]^+$  расщ. для  $C_{21}H_{28}N_6O_4S_3$  Н, 525,1412; найдено 525,1404.

**[0474]** Анализ захвата dCK выполняли в клеточной культуре. Все L1210 и CCRF-CEM клеточные линии культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 5 % FCS в 5 %  $CO_2$  37 °С инкубатора. Для анализов захвата клетки высевали с плотностью 50 000 клеток/лунку в Millipore MultiScreen GV 96 лунковых планшетах. 0,25 мкКи  $^3H$ -dC (Moravek Biochemicals) добавляли к клеткам одновременно с концентрациями ингибитора dCK при конечном объеме 100 мкл/лунку. Через 1 ч при 37 °С, клетки промывали четыре раза охлажденным льдом фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), используя Millipore вакуумный коллектор. Количество включенного зонда измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика с Perkin Elmer MicroBeta.

**[0475]** Экспрессия белка и очистка. Подробности о экспрессии варианта C4S S74E dCK и очистки подробно описаны в Nomme *et al.*

**[0476]** Кристаллизация, сбор рентгеновских данных и уточнения. Кристаллизацию, сбор данных и определение структуры dCK в комплексе с **15a** и **36** выполняли по общей методике как подробно описанного в Nomme *et al.* Специально для соединения **36**, кристаллы dCK в комплексе с UDP,  $MgCl_2$  и 2,5-кратный избыток ингибитора **36** выращивали, с использованием способа паровой диффузии висячей капли при 12 °С. Запасной раствор содержал 0,9 - 1,5 М тринатрия цитрат дегидрата и 25 мМ HEPES (pH 7,5). Дифракционные данные собирали в Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory на Life Sciences-Collaborative Access Team (LS-CAT) с пучком синхротронного излучения 21 ID-G.

**[0477]** Кинетический анализ. Стационарно режимный кинетический анализ и данные выравнивания выполняли как описано в Nomme *et al.*

**[0478]** Компьютерное моделирование. Все моделирования выполняли, используя MCPRO 2,0 пакет.<sup>41</sup> Начальные координаты были получены из рентгеновской структуры dCK в комплексе с соединением **15c**. Белок сольватировали в воде 30 Å кэп, представленного по классической модели воды TIP4P<sup>44</sup>. Атомы определяемого вещества были представлены силовым полем OPLS-AA<sup>45</sup>, которое использовали. Уравновешивания выполняли, используя подхода Монте-Карло (MC) в NPT ансамбле при 25 °С и 1 атм. Скелет белка и все длины связи в белке фиксировали; отбирали углы и торсионы в пределах 11 Å от центра связанной молекулы. Все степени свободы соединения

ингибитора отбирали во время моделирования уравнивания. Уравнивание состояло из  $5 \times 10^6$  конфигураций отбора проб, в которых были разрешены только движения растворителя, и  $10 \times 10^6$  последующих конфигураций для комплекса белок-ингибитор и для одного ингибитора в растворе. Уравновешенные системы затем подвергали моделированию пертурбации свободной энергии (FER)/МС. Эти моделирования состояли из 14 стадий пертурбации двойной ширины выборки образца. Во время FER, система испытывала  $5 \times 10^6$  конфигураций уравнивания растворителя, с последующими  $10 \times 10^6$  конфигурациями полного уравнивания, и  $25 \times 10^6$  конфигураций сбора данных. Все степени свободы ингибитора были отобраны за исключением тех связей, которые испытывают пертурбацию. Пертурбиновые длины связей систематически варьировали от исходной до конечной длины.

**[0479]** Исследования *in vivo* MicroPET/CT визуализации. Исследования на животных были одобрены комитетом по научным исследованиям на животных UCLA и проводили в соответствии с руководствами департамента медицины по лабораторным животным при UCLA. Для PET анализа печени, C57BL/6 мышам внутрибрюшинно (в.б.) вводили указанные количества ингибитора dCK (ресуспендированного в 40 % каптизоле) за 4 часа до внутривенной инъекции 70 мкКи  $^{18}\text{F}$ -L-FAC. Для анализа опухолевого ксенотрансплантата, NOD scid IL-2 рецептор гамма-цепи нокаута (NSG) несущих подкожную CCRF-CEM ксенотрансплантатную опухоль вводили 50 мг/кг соединения **36 или** носитель. Через четыре часа после того как обработанным мышам внутривенно вводили 70 мкКи  $^{18}\text{F}$ -L-FAC. Для всех исследований mPET/CT, интервал 1 ч был разрешен через введение зонда и сканирование mPET/CT (Inveon, Siemens Medical Solutions USA Inc.; microCAT, Imtek Inc.). Статические mPET изображения получали для 600s. Изображения анализировал, используя программное обеспечение для визуализации OsiriX версии 3,8.

**[0480]** Фармакокинетические исследования. C57Bl/6 самкам мышей, 8 недельного возраста, вводили разовую дозу указанных соединений (50 мг/кг, в.б.). Образцы крови (приблизительно 70 мкл) собирали через ретро-орбитальное кровотечение в гепаринизированные пробирки через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 35 мин, 40 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч и 6 ч. Образцы крови центрифугировали на  $20\,000 \times g$  в течение 5 мин чтобы отделить плазму. 1 мл ацетонитрил добавляли в 30 мкл плазмы. Супернатант переносили в новые пробирки и выпаривали используя SpeedVac. Образцы затем ресуспендировали в 50

мкл чистого ДМСО, и супернатант переносили в флаконы для образцы ЖХ/МС. Образцы затем прогнали на Agilent 6460 Triple Quad ЖХ/МС.

**[0481]** Статистический анализ. Все статистические данные, представленные как средние значения биологических повторений со стандартной ошибки среднего ( $\pm$  SEM), стандартным отклонением ( $\pm$  SD), или коробчатými диаграммами с максимальными и минимальными шумами. Р-значения значимости рассчитывали, используя один образец *t* тестовой функции Стьюдента в GraphPad Prism 5 (программное обеспечение GraphPad).

**[0482]** PDB ID КОДЫ: **Фигуры 27 и 28:** dCK + 15a + UDP Код: 4JLK. **Фигура 31:** dCK + 36 + UDP Код: 4L5B

**[0483]** Список литературы для примера 3:

1. Reichard, P., Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 1988, 57, 349-374.
2. Arner, E. S. J.; Eriksson, S., Mammalian Deoxyribonucleoside Kinases. *Pharmac. Ther.* 1995, 67, 155-186.
3. Sabini, E.; Hazra, S.; Ort, S.; Konrad, M.; Lavie, A., Structural Basis for Substrate Promiscuity of dCK. *J. Mol. Biol.* 2008, 378, 607-621.
4. Pasti, C.; Gallois-Montbrun, S.; Munier-Lehmann, H.; Vernon, M.; Gilles, A. M.; Deville-Bonne, D., Reaction of Human UMP-CMP Kinase with Natural and Analog Substrates. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270, 1784-1790.
5. Krishnan, P.; Gullen, E. A.; Lam, W.; Dutschman, G. E.; Grill, S. P.; Cheng, Y. C., Novel Role of 3-Phosphoglycerate Kinase, a Glycolytic Enzyme, in the Activation of L-Nucleoside Analogs, a new class of Anticancer and Antiviral Agents. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 36726-36732.
6. Toy, G.; Austin, W. R.; Liao, H.-I.; Cheng, D.; Singh, A.; Campbell, D. O.; Ishikawa, T.-o.; Lehmann, L. W.; Satyamurthy, N.; Phelps, M. E.; Herschman, H. R.; Czernin, J.; Witte, O. N.; Radu, C. G., Requirement for Deoxycytidine Kinase in T and B Lymphocyte Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107, 5551-5556.
7. Austin, W. R.; Armijo, A. L.; Campbell, D. O.; Singh, A. S.; Hsieh, T.; Nathanson, D.; Herschman, H. R.; Phelps, M. E.; Witte, O. N.; Czernin, J.; Radu, C. G., Nucleoside Salvage

Pathway Kinases Regulate Hematopoiesis by Linking Nucleotide Metabolism with Replication Stress. *J. Exp. Med.* 2012, 209, 2215-2228.

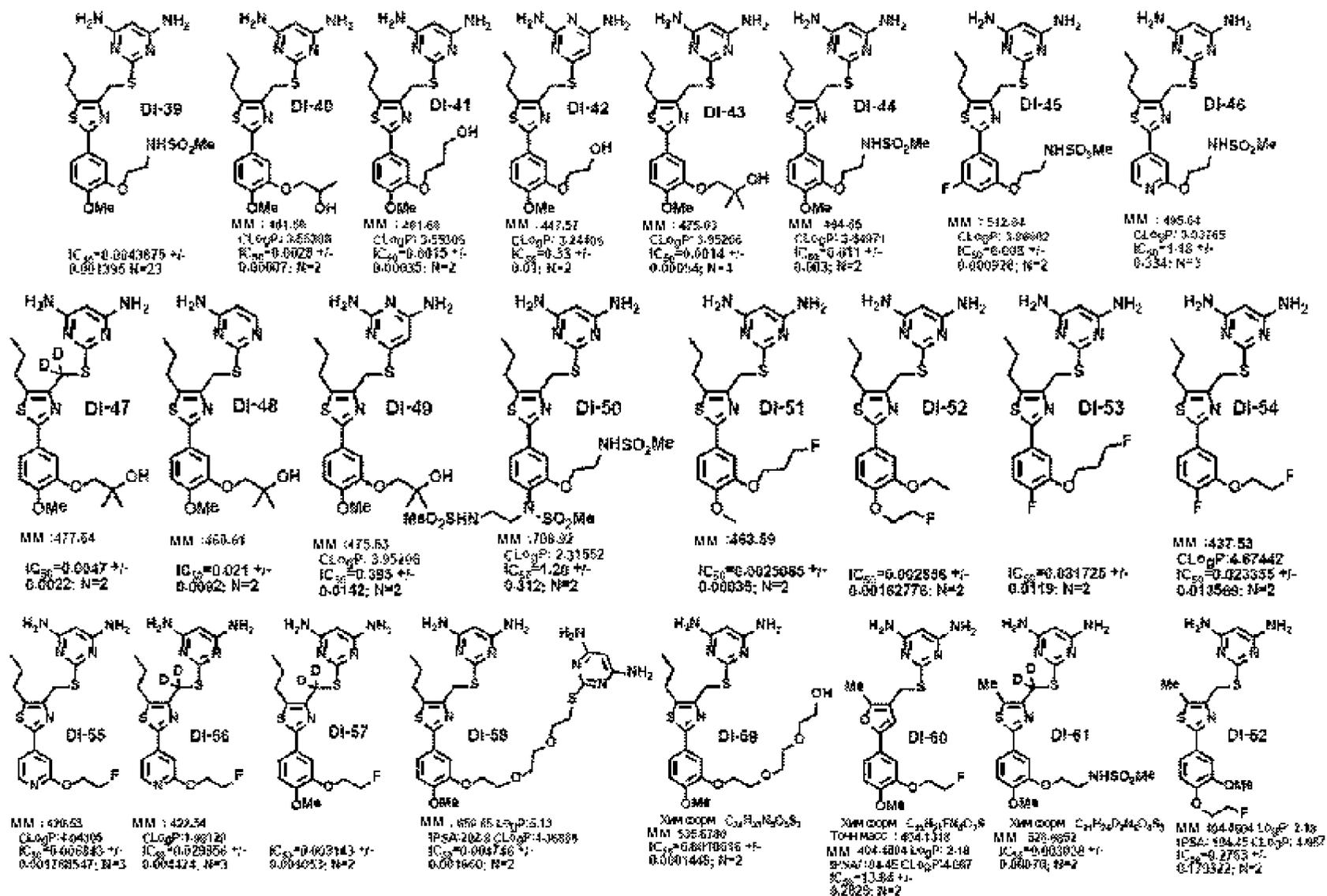
8. Van Rompay, A. R.; Johansson, M.; Karlsson, A., Substrate Specificity and Phosphorylation of Antiviral and Anticancer Nucleoside Analogs by Human Deoxyribonucleoside Kinases and Ribonucleoside Kinases. *Pharmacol. Ther.* 2003, 100, 119-139.
9. Yang, C.; Lee, M.; Hao, J.; Cui, X.; Guo, X.; Smal, C.; Bontemps, F.; Ma, S.; Liu, X.; Engler, D.; Parker, W. B.; Xu, B., Deoxycytidine kinase regulates the G2/M checkpoint through interaction with cyclin-dependent kinase 1 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* 2012, 40 (19), 9621-32.
10. Tarver, J. E.; Jessop, T. C.; Carlsen, M.; Augeri, D. J.; Fu, Q.; Healy, J. P.; Heim-Riether, A.; Xu, A.; Taylor, J. A.; Shen, M.; Keyes, P. E.; Kimball, S. D.; Yu, X.-C.; Miranda, M.; Liu, Q.; Swaffield, J. C.; Nouraldeen, A.; Wilson, A. G. E.; Rinch, R.; Jhaver, K.; Foushee, A. M. D.; Anderson, S.; Oravec, T.; Carson, K. G., 5-Fluorocytosine Derivatives as Inhibitors of Deoxycytidine Kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 6780-6783.
11. Yu, X.-C.; Miranda, M.; Liu, Z.; Patel, S.; Nguyen, N.; Carson, K.; Liu, Q.; Swaffield, J. C., Novel Potent Inhibitors of Deoxycytidine Kinase Identified and Compared by Multiple Assays. *J. Biomol. Screening* 2010, 15, 72-79.
12. Ward, A. D.; Baker, B. R., Irreversible Enzyme Inhibitors: Active-Site-Directed Inhibitors of Deoxycytidine Kinase. *J. Med. Chem.* 1977, 20, 88-92.
13. Jessop, T. C.; Tarver, J. E.; Carlsen, M.; Xu, A.; Healy, J. P.; Heim-Riether, A.; Fu, Q.; Taylor, J. A.; Augeri, D. J.; Shen, M.; Stouch, T. R.; Swanson, R. V.; Tari, L. W.; Hunger, M.; Hoffman, I.; Keyes, P. E.; Yu, X.-C.; Miranda, M.; Liu, Q.; Swaffield, J. C.; Kimball, S. D.; Nouraldeen, A.; Wilson, A. G. E.; Foushee, A. M. D.; Jhaver, K.; Finch, R.; Anderson, S.; Oravec, T.; Carson, K. G., Lead Optimization and Structure-based Design of Potent and Bioavailable Deoxycytidine Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 6784-6787.
14. Weber, W. A.; Grosu, A. L.; Czernin, J., Technology Insight: Advances in Molecular Imaging and an Appraisal of PET/CT Scanning. *Nat. Clin. Prac. Oncol.* 2008, 5, 160-170.

15. Czernin, J.; Benz, M. R.; Allen-Auerbach, M. S., PET/CT Imaging: The Incremental Value of Assessing the Glucose Metabolic Phenotype and the Structure of Cancers in a Single Examination. *Eur. J. Radiol.* 2010, 73, 470-480.
16. Gambhir, S. S., Molecular Imaging of Cancer with Positron Emission Tomography. *Nat. Rev. Cancer* 2002, 2, 683-693.
17. Rigo, P.; Paulus, P.; Kaschten, B. J.; Hustinx, R.; Bury, T.; Jerusalem, G.; Benoit, T.; Foidart Willems, J., Oncological Application of Positron Emission Tomography with Fluorine-18. *Eur. J. Nucl. Med.* 1996, 23, 1641-1674.
18. Wood, K. A.; Hoskin, P. J.; Saunders, M. I., Positron Emission Tomography in Oncology: A Review. *Clin. Oncol.* 2007, 19, 237-255.
19. Weber, W. A., Positron Emission Tomography as an Imaging Biomarker. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 3282-3292.
20. Oriuchi, N.; Higuchi, T.; Ishikita, T.; Miyakubo, M.; Hanaoka, H.; Iida, Y.; Endo, K., Present Role and Future Prospects of Positron Emission Tomography in Clinical Oncology. *Cancer Sci.* 2006, 97, 1291-1297.
21. Jadvar, H.; Alavi, A.; Gambhir, S. S., 18F-FDG Uptake in Lung, Breast, and Colon Cancers: Molecular Biology Correlates and Disease Characterization. *J. Nucl. Med.* 2009, 50, 1820-1827.
22. Hargreaves, R. J., The Role of Molecular Imaging in Drug Discovery and Development. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008, 83, 349-353.
23. Wang, J. L.; Maurer, L., Positron Emission Tomography: Applications in Drug Discovery and Drug Development. *Curr. Top. Med. Chem.* 2005, 5, 1053-1075.
24. Wagner, C. C.; Muller, M.; Lappin, G.; Langer, O., Positron Emission Tomography for Use in Microdosing Studies. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2008, 11, 104-110.
25. Laing, R. E.; Walter, M. A.; Campbell, D. O.; Herschman, H. R.; Satyamurthy, N.; Phelps, M. E.; Czernin, J.; Witte, O. N.; Radu, C. R., Noninvasive Prediction of Tumor Responses to Gemcitabine using Positron Emission Tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009, 106, 2847-2852.

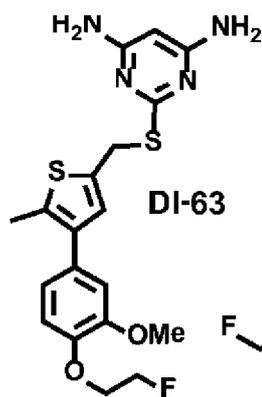
26. Radu, C. G.; Shu, C. J.; Nair-Gill, E.; Shelly, S. M.; Barrio, J. R.; Satyamurthy, N.; Phelps, M. E.; Witte, O. N., Molecular Imaging of Lymphoid Organs and Immune Activation by Positron Emission Tomography with a new [18F]-labeled 2'-deoxycytidine Analog. *Nat. Med.* 2008, 14, 783-788.
27. Shu, C. J.; Campbell, D. O.; Lee, J. T.; Tran, A. Q.; Wengrod, J. C.; Witte, O. N.; Phelps, M. E.; Satyamurthy, N.; Czernin, J.; Radu, C. R., Novel PET Probes Specific for Deoxycytidine Kinase. *J. Nucl. Med.* 2010, 51, 1092-1098.
28. Fan, F.; Wood, K. V., Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 2007, 5, 127-136.
29. Müller, K.; Faeh, C.; Diederich, F., Fluorine in Pharmaceuticals: Looking Beyond Intuition. *Science* 2007, 317, 1881-1886.
30. Park, B. K.; Kitteringham, N. R.; O'Neill, P. M., Metabolism of Fluorine-containing Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001, 41, 443-470.
31. Crane, L. J.; Anastassiadou, M.; Stigliani, J.-L.; Baziard-Mouysset, G.; Payard, M., Reactions of Some Ortho and Para Halogenated Aromatic Nitriles with Ethylenediamine: Selective Synthesis of Imidazolines. *Tetrahedron* 2004, 60, 5325-5330.
32. Okonya, J. F.; Hoffman, R. V.; Johnson, M. C., Synthesis of 2-Oxazolone-4-Carboxylates from 3-Nosyloxy- and 3-Bromo-2-ketoesters. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 1102-1108.
33. Trullinger, T. K.; Hunter, R.; Garizi, N.; Yap, M. C. H.; Buysse, A. M.; Pernich, D.; Johnson, T. C.; Bryan, K.; Deamicis, C.; Zhang, Y.; Niyaz, N. M.; McLeod, C. L.; Ross, R.; Zhu, Y.; Johnson, P. L.; Eckelbarger, J. D.; Parker, M. H., Pesticidal Compositions. Patent application US 2010/0292253 A1.
34. Joseph, K. M.; Larraza-Sanchez, I., Synthesis of Benzyl Bromides with Hexabromoacetone: an Alternative Path to Drug Intermediates. *Tetrahedron Lett.* 2011, 52, 13-16.
35. Laxer, A.; Major, D. T.; Gottlieb, H. E.; Fischer, B., (15N5)-Labeled Adenine Derivatives: Synthesis and Studies of Tautomerism by 15N NMR Spectroscopy and Theoretical Calculations. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 5463-5481.

36. Chottiner, E. G.; Shewach, D. S.; Datta, N. S.; Ashcraft, E.; Gribbin, D.; Ginsburg, D.; Fox, I. H.; Mitchell, B. S., Cloning and Expression of Human Deoxycytidine Kinase cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991, 88, 1531-1535.
37. Shewach, D. S.; Reynolds, K. K.; Hertel, L., Nucleotide Specificity of Human Deoxycytidine Kinase. Mol. Pharmacol. 1992, 42, 518-524.
38. Metropolis, N.; Ulam, S., The Monte Carlo Method. J. Am. Statistical Assn. 1949, 44, 335-341.
39. Zwanzig, R. W., High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. J. Chem. Phys. 1954, 22, 1420-1426.
40. Jorgensen, W. L.; Thomas, L. L., Perspective on Free-Energy Perturbation Calculations for Chemical Equilibria. J. Chem. Theory Comput 2008, 4, 869-876.
41. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J., Molecular Modeling of Organic and Biomolecular Systems Using BOSS and MCPRO. J. Comput. Chem. 2005, 26, 1689-1700.
42. Shu, Y. Z.; Johnson, B. M.; Yang, T. J., Role of biotransformation studies in minimizing metabolism-related liabilities in drug discovery. AAPS 2008, 10, 178-192.
43. Bhattacharyya, S., Application of Positron Emission Tomography in Drug Development. Biochem. Pharmacol. 2012, 1, 1000e128.
44. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L., Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. J. Chem. Phys. 1983, 79, 926-935.
45. Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J., Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 11225-11236.

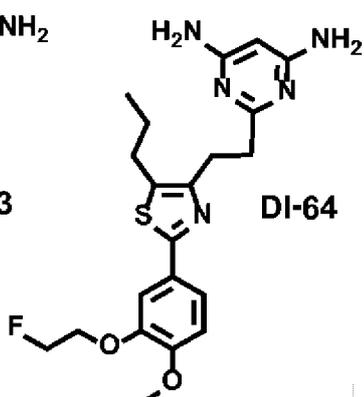
#### **4. Пример 4:**



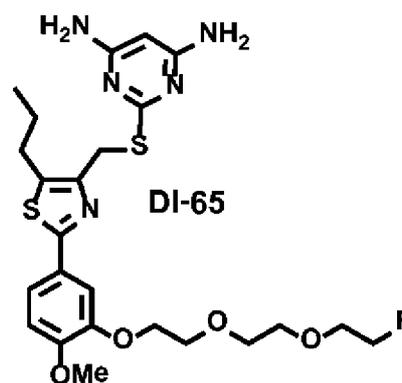




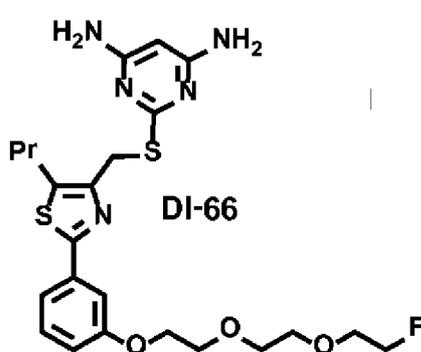
M.M.: 420.5214  
 LogP: 2.23 tPSA: 95.22  
 CLogP: 3.55306  
 IC<sub>50</sub>=1.581 +/-  
 0.0212; N=2



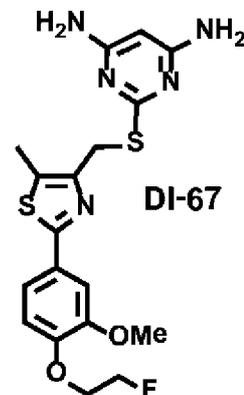
Хим. форм. C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S  
 M.M.: 431.5304 LogP: 3.59  
 tPSA: 107.58 CLogP: 4.04506  
 IC<sub>50</sub>=0.6639 +/-  
 0.3655; N=3



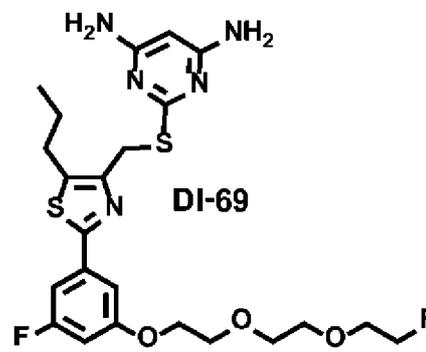
M.M.: 537.67 LogP: 4.69  
 tPSA: 126.04  
 IC<sub>50</sub>=0.00421 +/-  
 0.001983; N=2



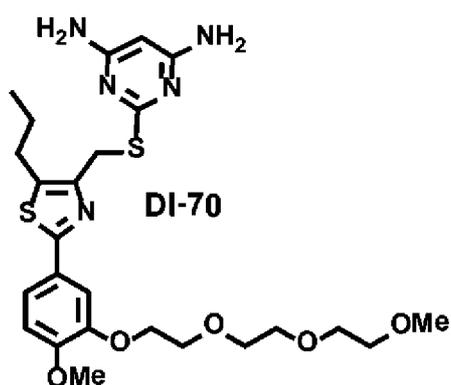
Хим. форм. C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>  
 M.M.: 507.6434 LogP: 3.13  
 tPSA: 116.81 CLogP: 4.26931  
 IC<sub>50</sub>=0.069085 +/-  
 0.046407; N=2



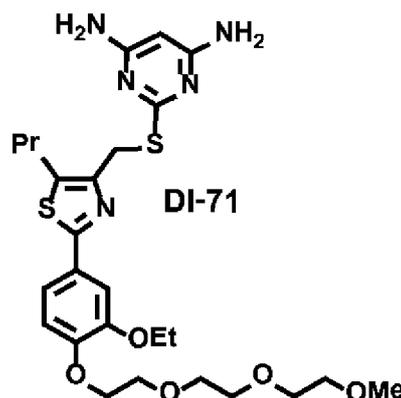
Хим. форм. C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>  
 M.M.: 420.5214 LogP: 2.91  
 tPSA: 95.22 CLogP: 4.55307  
 IC<sub>50</sub>=0.26295 +/-  
 0.15662; N=2



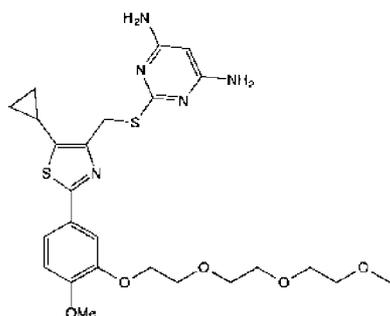
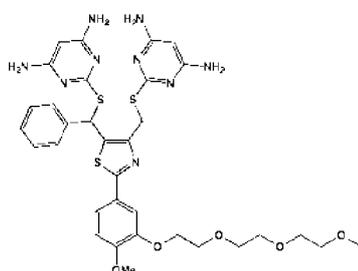
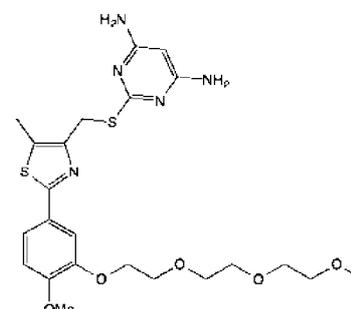
M.M.: 525.6338  
 IC<sub>50</sub>=0.0033685 +/-  
 0.00358; N=2



M.M.: 549.7050  
 LogP: 4.34 tPSA: 135.27  
 IC<sub>50</sub>=0.003307 +/-  
 0.000442; N=2



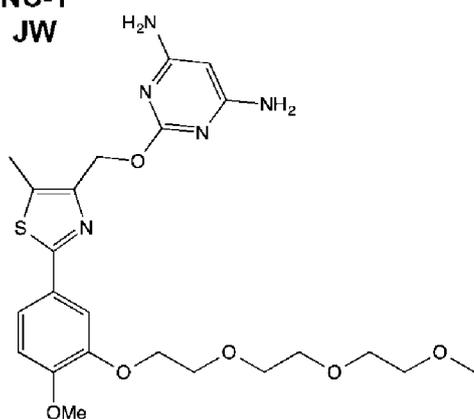
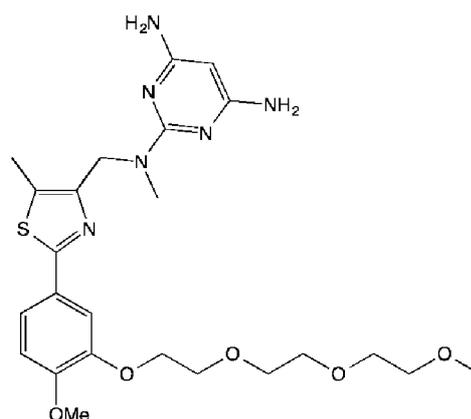
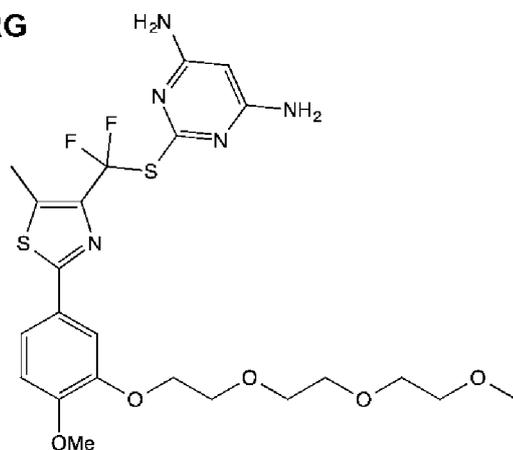
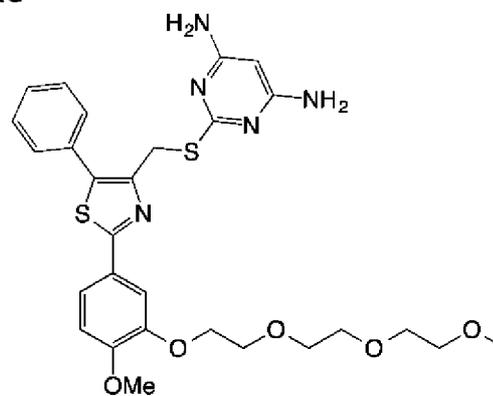
Хим. форм. C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>  
 Точн. масс.: 563.2236  
 M.M.: 563.7320 LogP: 3  
 tPSA: 135.27 CLogP: 4.28466  
 IC<sub>50</sub>=0.0023695 +/-  
 0.0004348; N=2

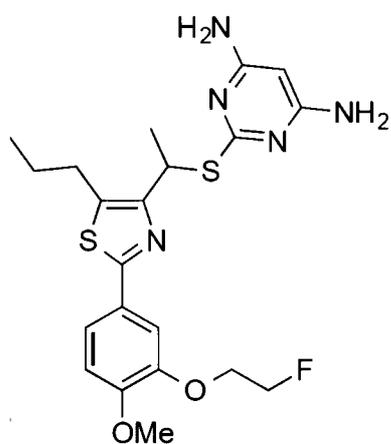
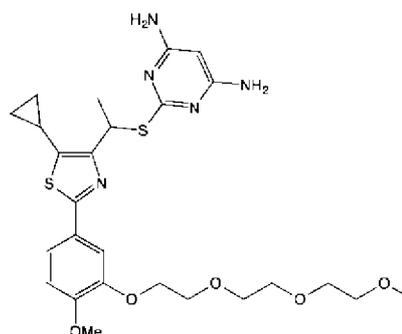
**DI-77****DI-78****DI-79**

-  $IC_{50} = 0.0052835 \pm 0.003533$ ; N=2

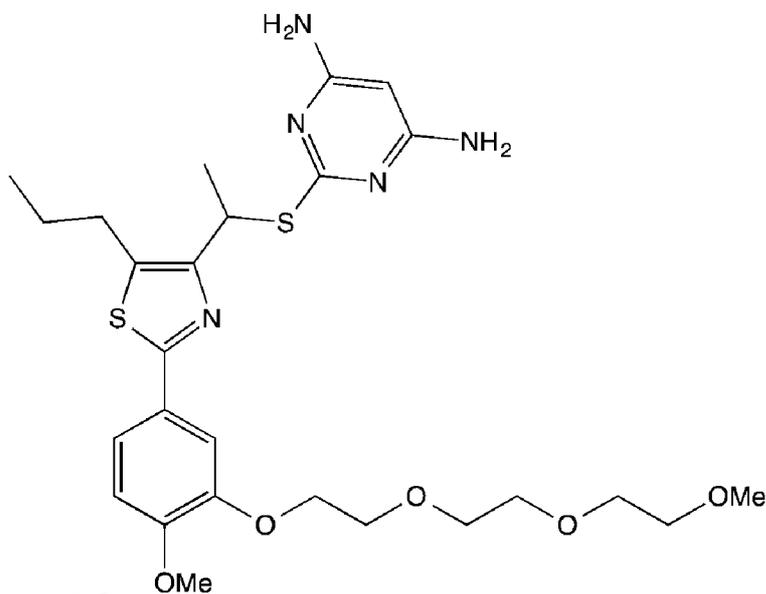
$IC_{50} = 1.665 \pm 0.60$ ; N=2

$IC_{50} = 0.009301 \pm 0.0002418$ ; N=2

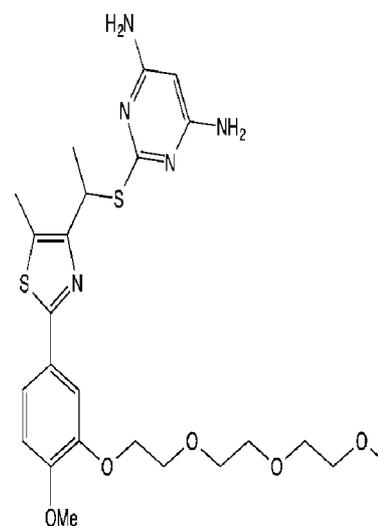
**NC-1  
JW****NC-2  
JW****NC-4  
RG****NC-9  
RG**

5. Пример 5:**DI-80**

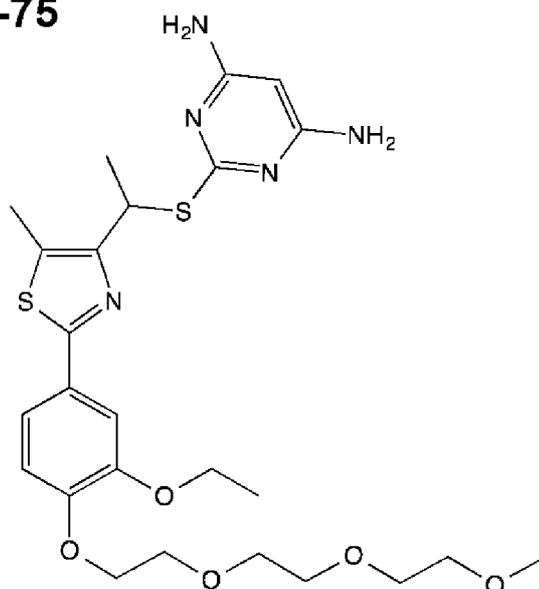
$IC_{50} = 0.010 \pm 0.0043; N = 3$      $IC_{50} = 0.002465 \pm 0.003202; N = 2$

**DI-73**

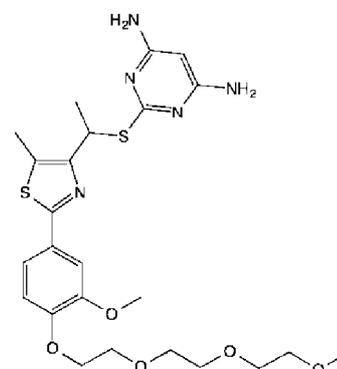
$IC_{50} = 0.006006 \pm 0.002477; N = 2$

**DI-74**

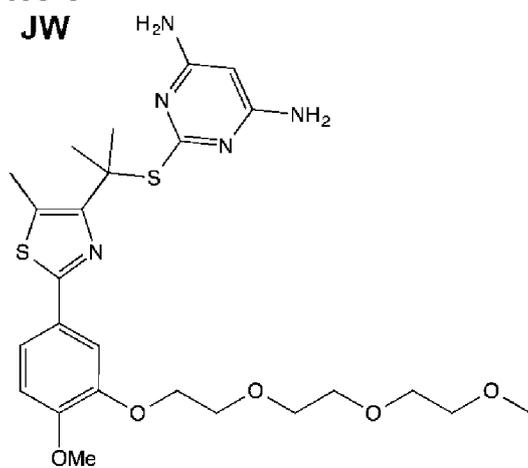
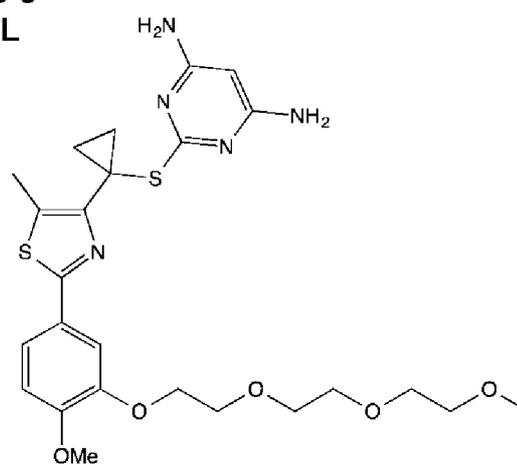
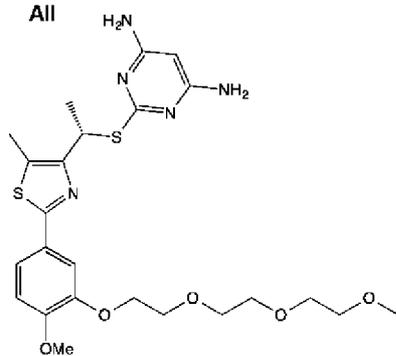
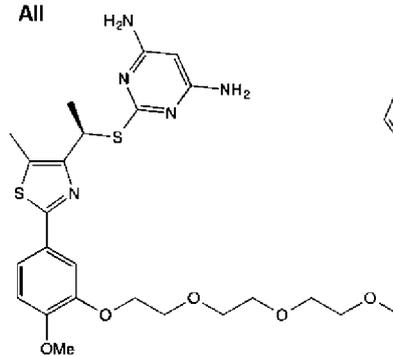
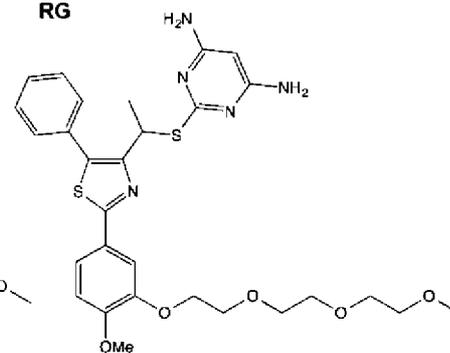
$IC_{50} = 0.0080306 \pm 0.003160; N = 3$

**DI-75**

$IC_{50} = 0.0032 \pm 0.0032$ ;  
N = 2

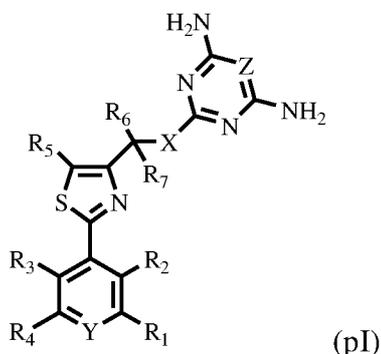
**DI-76**

$IC_{50} = 0.006124 \pm$   
;  $0.003206$  N = 2

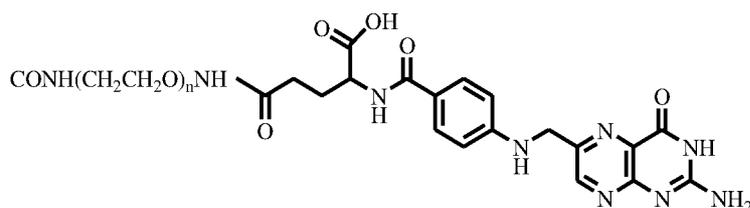
**NC-3  
JW****NC-5  
ZL****NC-6  
All****NC-7  
All****NC-8  
RG**

## VII. Варианты реализации изобретения:

[0484] Вариант реализации изобретения P1 соединение формулы (pI):

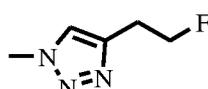
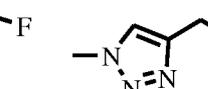


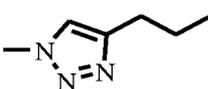
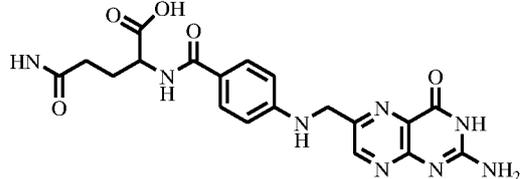
или его соль, где: каждый Y и Z представляет собой независимо CR<sub>8</sub> или N; R<sub>8</sub> представляет собой H, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CF<sub>3</sub>, <sup>18</sup>F или OR<sub>9</sub>; R<sub>9</sub> независимо представляет собой CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CD<sub>3</sub>, CD<sub>2</sub>CD<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>18</sup>F,

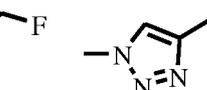
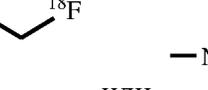


CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>18</sup>F,

(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>G или COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>L; n представляет собой 2 – 20; G представляет собой H, OH, NH<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, F, Cl, N<sub>3</sub>, <sup>18</sup>F, NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>(p), NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F(p), NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub><sup>18</sup>F(p), NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>(o), NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F(o),

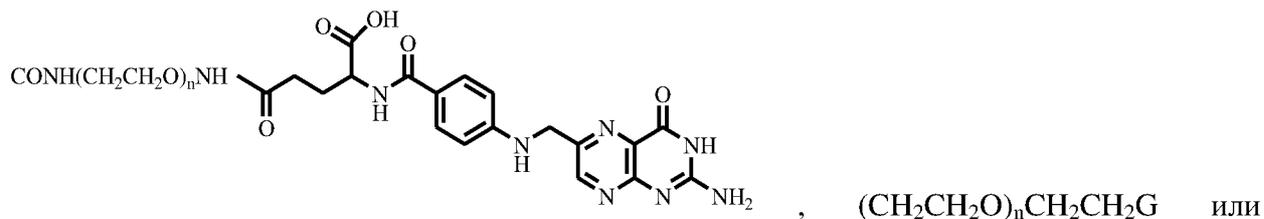
NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub><sup>18</sup>F(o), , ,  или

 ; L is H, OH, NH<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>, F, Cl, ,

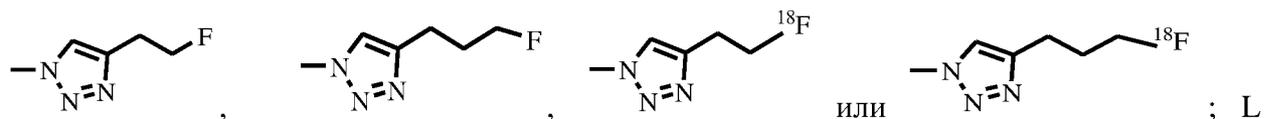
, ,  или  ;

R<sub>1</sub> и R<sub>4</sub> независимо представляют собой H, F, Cl, Br, I, CF<sub>3</sub>, <sup>18</sup>F или OR<sub>10</sub>; R<sub>10</sub> независимо представляет собой H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CD<sub>3</sub>, CD<sub>2</sub>CD<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F,

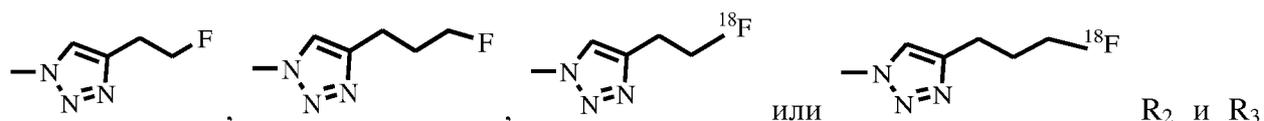
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{F})\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{F})\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$ ,  
 $\text{CH}_2\text{CH}(^{18}\text{F})\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(^{18}\text{F})\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{Cl})\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{Cl})\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$ ,  
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F})\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,



$\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{L}$ ; n представляет собой 2 – 20; G представляет собой  
 H, OH,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OCF}_3$ , F, Cl,  $\text{N}_3$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2(\text{p})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{F}(\text{p})$ ,  
 $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}(\text{p})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2(\text{o})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{F}(\text{o})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}(\text{o})$ ,

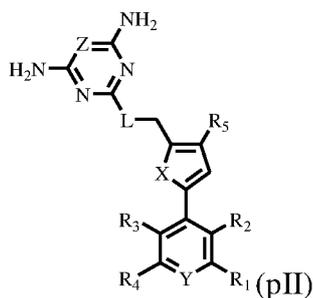


представляет собой H, OH,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OCH}_3$ , F, Cl

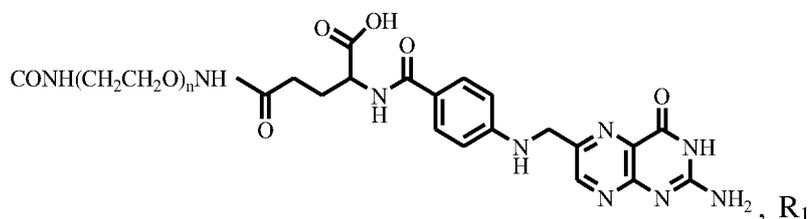


независимо представляют собой H, F, Cl, Br, I или  $\text{OR}_{11}$ ;  $\text{R}_{11}$  независимо представляет  
 собой H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CD}_3$ ,  $\text{CD}_2\text{CD}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ ,  
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{SO}_2\text{CH}_3$ , или  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F})\text{SO}_2\text{CH}_3$ ;  $\text{R}_5$  независимо  
 представляет собой H,  $\text{C}_1 - \text{C}_6$  n-алкильную цепь,  $\text{C}_1 - \text{C}_6$  разветвленную алкильную цепь,  
 $\text{CH}_2 - \text{C}_3 - \text{C}_6$  циклоалкил,  $(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{OCH}_3$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{F}$ ,  $(\text{CH}_2)_m^{18}\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  
 $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}$ ,  
 $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$ , 2-, 3- или 4-пиридил, 3-фтор-4-пиридил, 3-  
 $[^{18}\text{F}]$ фтор-4-пиридил или  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -2-, 3- или 4-пиридил; m представляет собой 1 – 6; X  
 представляет собой  $\text{CH}_2$ , O,  $\text{NR}_{12}$ , S, SO или  $\text{SO}_2$ ;  $\text{R}_{12}$  представляет собой H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  
 $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ;  $\text{R}_6$  и  $\text{R}_7$  независимо представляют собой H, D, F,  $\text{CH}_3$  или R и S  $\text{CH}_3$   
 стереоизомеры; и  $\text{R}_6$  и  $\text{R}_7$  вместе  $\text{C}_3 - \text{C}_6$  циклоалкил.

[0485] Вариант реализации изобретения P2 соединение формулы (pII):

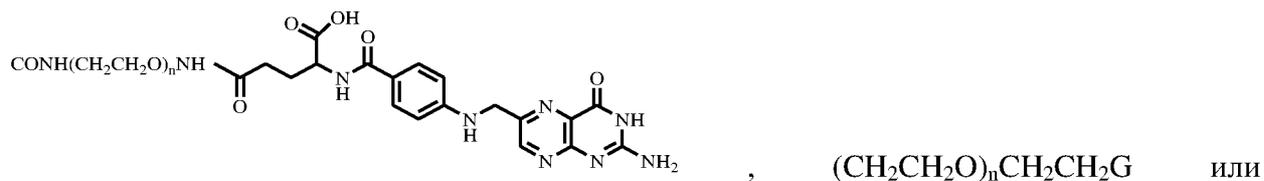


или его соль, где: каждый Y и Z представляет собой независимо CR<sub>6</sub> или N; R<sub>6</sub> представляет собой H, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CF<sub>3</sub>, <sup>18</sup>F или OR<sub>7</sub>; R<sub>7</sub> независимо представляет собой CH<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F,

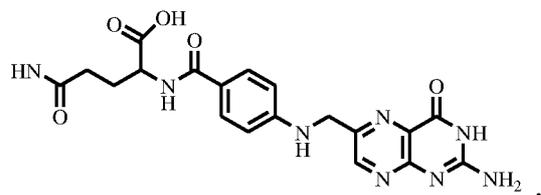
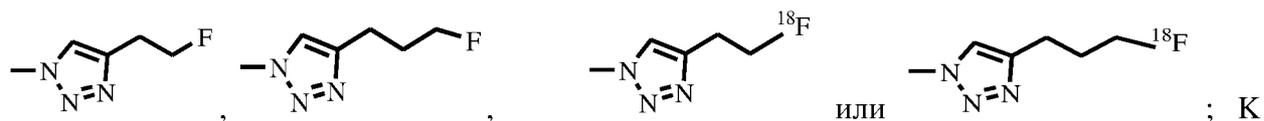


CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>18</sup>F или CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>18</sup>F,

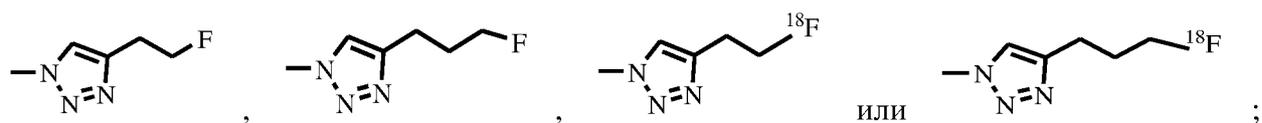
и R<sub>4</sub> независимо представляют собой H, F, Cl, Br, I, <sup>18</sup>F или OR<sub>8</sub>; R<sub>8</sub> независимо представляет собой H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>18</sup>F, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>18</sup>F, CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>18</sup>F)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,



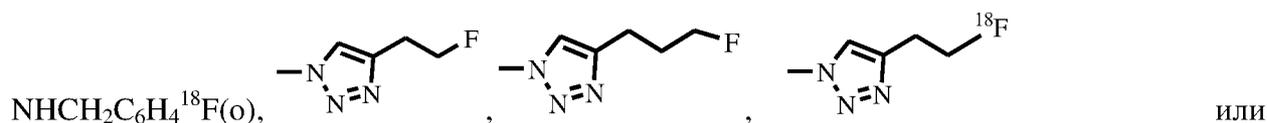
COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>K; n представляет собой 2 – 20; G представляет собой H, OH, NH<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, F, Cl, N<sub>3</sub>, <sup>18</sup>F, NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>(p), NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F(p), NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub><sup>18</sup>F(p), NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>(o), NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F(o), NHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub><sup>18</sup>F(o),



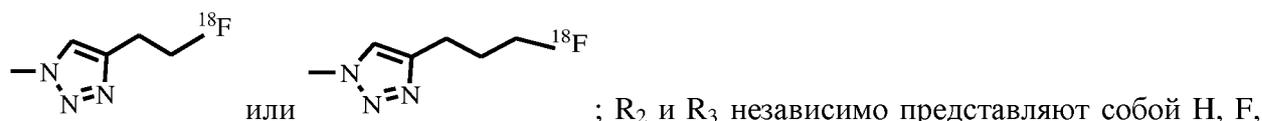
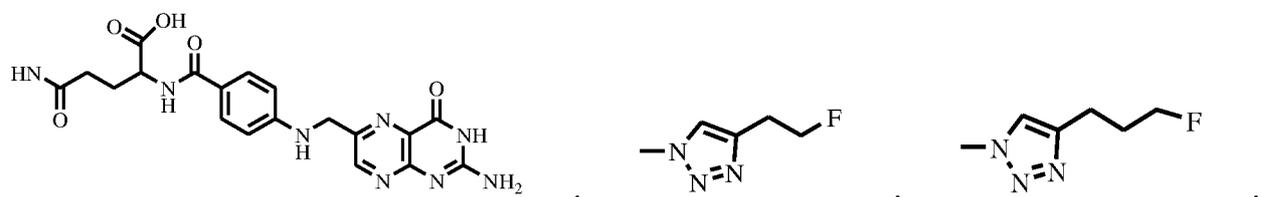
представляет собой H, OH, NH<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>, F, Cl,



$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{G}$  или  $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{K}$ ;  $n$  представляет собой 2 – 20;  $G$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OCF}_3$ ,  $\text{F}$ ,  $\text{Cl}$ ,  $\text{N}_3$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2(\text{p})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{F}(\text{p})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}(\text{p})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2(\text{o})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{F}(\text{o})$ ,



$\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}(\text{o})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}(\text{o})$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}(\text{o})$  или  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}(\text{o})$ ;  $K$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{F}$ ,  $\text{Cl}$ ,



;  $R_2$  и  $R_3$  независимо представляют собой  $\text{H}$ ,  $\text{F}$ ,  $\text{Cl}$ ,  $\text{Br}$ ,  $\text{I}$  или  $\text{OR}_9$ ;  $R_9$  независимо представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F})\text{SO}_2\text{CH}_3$ , или  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F})\text{SO}_2\text{CH}_3$ ;  $R_5$  независимо представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{C}_1 - \text{C}_6$  n-алкильная цепь,  $\text{C}_1 - \text{C}_6$  разветвленную алкильную цепь,  $\text{CH}_2 - \text{C}_3 - \text{C}_6$  циклоалкил,  $(\text{CH}_2)_m\text{OH}$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{OCH}_3$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{F}$ ,  $(\text{CH}_2)_m^{18}\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4^{18}\text{F}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$ , 2-, 3- или 4-пиридил, 3-фтор-4-пиридил, 3- [ $^{18}\text{F}$ ]фтор-4-пиридил или  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ -2-, 3- или 4-пиридил;  $m$  представляет собой 1 – 6;  $X$  представляет собой  $\text{O}$ ,  $\text{NR}_{10}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{SO}$  или  $\text{SO}_2$ ;  $R_{10}$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ; и  $L$  представляет собой  $\text{CH}_2$ ,  $\text{O}$ ,  $\text{NR}_{10}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{SO}$ ,  $\text{SO}_2$ .

**[0486]** Вариант реализации изобретения P3, где соединение имеет формулу, показанную в Приложении А, Приложении В или Приложении С (Примеры 1-5).

**[0487]** Вариант реализации изобретения P4. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P3, где соединение связывается с полипептидом дезоксицитидинкиназы.

**[0488]** Вариант реализации изобретения P5 Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P4, или его соль, и фармацевтически приемлемый носитель.

**[0489]** Вариант реализации изобретения P6. Способ ингибирования активности дезоксицитидинкиназы (dCK), включающий контактирование соединения по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P5 с дезоксицитидинкиназой.

**[0490]** Вариант реализации изобретения P7. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества соединения по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P5, или его фармацевтически приемлемой соли, и тимидин, где соединение вводят в сочетании с тимидином.

**[0491]** Вариант реализации изобретения P8. Способ варианта реализации изобретения P7, где рак представляет собой лейкоз, лимфому, рак молочной железы, рак яичников, рак легкого, рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, саркому, рак головы и шеи, глиому, глиобластому, или рак ткани независимо от происхождения, который характеризуется геномной нестабильностью и/или активацией ответа повреждения ДНК.

**[0492]** Вариант реализации изобретения P9. Способ лечения иммунного нарушения у индивидуума, который в этом нуждается, включающий введение индивидууму эффективного количества соединения по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P5, или его фармацевтически приемлемой соли.

**[0493]** Вариант реализации изобретения P10. PET зонд, включающий соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P5.

**[0494]** Вариант реализации изобретения P11. Способ визуализации, включающий: контактирование соединения из варианта реализации изобретения P10 с биологическим материалом; применение PET визуализации для определения локальной концентрации соединения в биологическом материале; и соотнесение локальной концентрации соединения с локальным иммунным ответом или присутствием опухолевой ткани.

**[0495]** Вариант реализации изобретения P12. Способ варианта реализации изобретения P11, где контактирование соединения с биологическим материалом включает введение количества соединения животному или человеку; и соотнесение локальной концентрации

соединения в животном или человеке с локальным иммунным ответом или опухолевой тканью в животном или человеке.

**[0496]** Вариант реализации изобретения P13. Способ варианта реализации изобретения P12, дополнительно включающий использование локальной концентрации соединения для диагностики рака и/или мониторинга лечения рака.

**[0497]** Вариант реализации изобретения P14. Способ вариантов реализации изобретения P11, где животное или человек имеет состояние, выбранное из группы, состоящей из рака, аутоиммунного нарушения, расстройства развития, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, паразитарной инфекции, инфекции, метаболического заболевания и воспаления.

**[0498]** Вариант реализации изобретения P15. Способ варианта реализации изобретения P11, где животное или человек имеет состояние, выбранное из группы, состоящей из лимфоденопатии, меланомы, лейкоза и глиомы.

**[0499]** Вариант реализации изобретения P16. Способ варианта реализации изобретения P11, где животное или человек имеет состояние, выбранное из группы, состоящей из ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника, экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ), рассеянного склероза, диабета типа 1 и атеросклероза.

**[0500]** Вариант реализации изобретения P17. Способ варианта реализации изобретения P11, где животное или человек подвергают терапии, выбранной из группы, состоящей из иммунотерапии рака, иммунотерапии, терапии интерфероном, вакцинации, лучевой терапии, химиотерапии, и терапии антибиотиками.

**[0501]** Вариант реализации изобретения P18. Способ прогнозирования резистентности к онколитическому агенту, включающий: контактирование соединения по любому из вариантов реализации изобретения P1-P5 с опухолью; применение PET визуализации для определения локальной концентрации соединения в опухоли; сравнение локальной концентрации соединения с базовым уровнем; соотнесение локальной концентрации соединения в значительной степени более низкой чем базовый уровень с низкой dСК экспрессией опухоли; соотнесение низкой dСК экспрессии опухоли с резистентностью к онколитическому нуклеозидному аналогу, где базовый уровень соответствует измеренной концентрации соединения в типичных опухолевых клетках, которые экспрессируют dСК,

концентрации соединения в типичных опухолевых клетках, которые не экспрессируют dCK, или взвешенному среднему.

**[0502]** Вариант реализации изобретения P19. Способ варианта реализации изобретения P18, где опухоль является Т лимфоцитного происхождения.

**[0503]** Вариант реализации изобретения P20. Способ для проверки использования соединения в PET процессе, где способ включает стадии: (a) введения “холодного” атома фтора 19 в определенное положение в соединении по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 5; (b) замещение “холодного” атома фтора 19 на “горячий” атом фтора 18; (c) введение соединения со стадии (b) млекопитающему; и (d) детектирование и/или количественное определение соединения со стадии (b) по всему телу млекопитающего, используя PET визуализацию.

**[0504]** Вариант реализации изобретения P21. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P4, где R<sub>6</sub> представляет собой метил.

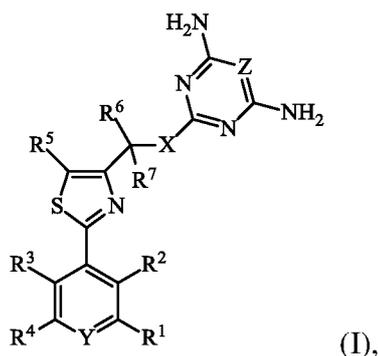
**[0505]** Вариант реализации изобретения P22. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P4 и P21, где R<sub>6</sub> присоединяется к углероду, имеющему (R) стереохимию.

**[0506]** Вариант реализации изобретения P23. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P4 и P21 - P22, где R<sub>5</sub> представляет собой незамещенный C<sub>1</sub> – C<sub>6</sub> алкил, предпочтительно метил.

**[0507]** Вариант реализации изобретения P24. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P4 и P21 - P23, где R<sub>7</sub> представляет собой водород и присоединяется к углероду, имеющему (R) стереохимию

**[0508]** Вариант реализации изобретения P25. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения P1 - P4 и P21 - P24, где R<sub>9</sub> представляет собой – O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHS(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

**[0509]** Вариант реализации изобретения 1. Соединение, имеющее формулу:



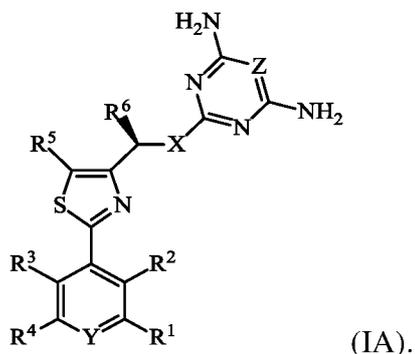
где: Y представляет собой C(R<sup>8</sup>) или N; Z представляет собой C(R<sup>9</sup>) или N; X представляет собой CH<sub>2</sub>, O, N(R<sup>10</sup>), S, S(O) или S(O)<sub>2</sub>; R<sup>1</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>1A</sup>, -OR<sup>1A</sup>, -NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -C(O)OR<sup>1A</sup>, -C(O)NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>R<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>OR<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NHN<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -ONR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NHC(O)NHN<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил; R<sup>2</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>2A</sup>, -OR<sup>2A</sup>, -NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -C(O)OR<sup>2A</sup>, -C(O)NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>R<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>OR<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NHN<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -ONR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NHC(O)NHN<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил; R<sup>3</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>3A</sup>, -OR<sup>3A</sup>, -NR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -C(O)OR<sup>3A</sup>, -C(O)NR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>3A</sup>, -S(O)<sub>n3</sub>R<sup>3A</sup>, -S(O)<sub>n3</sub>OR<sup>3A</sup>, -S(O)<sub>n3</sub>NR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -NHN<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -ONR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -NHC(O)NHN<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил; R<sup>4</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>4A</sup>, -OR<sup>4A</sup>, -NR<sup>4A</sup>R<sup>4B</sup>, -C(O)OR<sup>4A</sup>, -C(O)NR<sup>4A</sup>R<sup>4B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>4A</sup>, -S(O)<sub>n4</sub>R<sup>4A</sup>, -S(O)<sub>n4</sub>OR<sup>4A</sup>, -S(O)<sub>n4</sub>NR<sup>4A</sup>R<sup>4B</sup>, -NHN<sup>4A</sup>R<sup>4B</sup>, -ONR<sup>4A</sup>R<sup>4B</sup>, -NHC(O)NHN<sup>4A</sup>R<sup>4B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил; R<sup>5</sup> независимо представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>,

-CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>5A</sup>, -OR<sup>5A</sup>, -NR<sup>5A</sup>R<sup>5B</sup>, -C(O)OR<sup>5A</sup>, -C(O)NR<sup>5A</sup>R<sup>5B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>5A</sup>, -S(O)<sub>n5</sub>R<sup>5A</sup>, -S(O)<sub>n5</sub>OR<sup>5A</sup>, -S(O)<sub>n5</sub>NR<sup>5A</sup>R<sup>5B</sup>, -NHN<sup>5A</sup>R<sup>5B</sup>, -ONR<sup>5A</sup>R<sup>5B</sup>, -NHC(O)NHN<sup>5A</sup>R<sup>5B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил, где R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> необязательно объединяются с образованием замещенного или незамещенного циклоалкила; R<sup>6</sup> представляет собой незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил; R<sup>7</sup> представляет собой H, D, F или -CH<sub>3</sub>; R<sup>8</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>8A</sup>, -OR<sup>8A</sup>, -NR<sup>8A</sup>R<sup>8B</sup>, -C(O)OR<sup>8A</sup>, -C(O)NR<sup>8A</sup>R<sup>8B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>8A</sup>, -S(O)<sub>n8</sub>R<sup>8A</sup>, -S(O)<sub>n8</sub>OR<sup>8A</sup>, -S(O)<sub>n8</sub>NR<sup>8A</sup>R<sup>8B</sup>, -NHN<sup>8A</sup>R<sup>8B</sup>, -ONR<sup>8A</sup>R<sup>8B</sup>, -NHC(O)NHN<sup>8A</sup>R<sup>8B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил; R<sup>9</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>9A</sup>, -OR<sup>9A</sup>, -NR<sup>9A</sup>R<sup>9B</sup>, -C(O)OR<sup>9A</sup>, -C(O)NR<sup>9A</sup>R<sup>9B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>9A</sup>, -S(O)<sub>n9</sub>R<sup>9A</sup>, -S(O)<sub>n9</sub>OR<sup>9A</sup>, -S(O)<sub>n9</sub>NR<sup>9A</sup>R<sup>9B</sup>, -NHN<sup>9A</sup>R<sup>9B</sup>, -ONR<sup>9A</sup>R<sup>9B</sup>, -NHC(O)NHN<sup>9A</sup>R<sup>9B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил; R<sup>10</sup> представляет собой H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; R<sup>1A</sup>, R<sup>1B</sup>, R<sup>2A</sup>, R<sup>2B</sup>, R<sup>3A</sup>, R<sup>3B</sup>, R<sup>4A</sup>, R<sup>4B</sup>, R<sup>5A</sup>, R<sup>5B</sup>, R<sup>8A</sup>, R<sup>8B</sup>, R<sup>9A</sup>, и R<sup>9B</sup> независимо представляют собой водород, оксо, галоген, -CF<sub>3</sub>, -CN, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -SH, -S(O)<sub>2</sub>Cl, -S(O)<sub>3</sub>H, -S(O)<sub>4</sub>H, -S(O)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NHNH<sub>2</sub>, -ONH<sub>2</sub>, -NHC(O)NHNH<sub>2</sub>, -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -NHS(O)<sub>2</sub>H, -NHC(O)H, -NHC(O)-OH, -NHOH, -OCF<sub>3</sub>, -OCHF<sub>2</sub>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил; и n1, n2, n3, n4, n5, n8 и n9 независимо представляют собой 1, 2, или 3.

**[0510]** Вариант реализации изобретения 2. Соединение варианта реализации изобретения 1, где R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> представляют собой водород.

**[0511]** Вариант реализации изобретения 3. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 2, где R<sup>7</sup> представляет собой водород.

**[0512]** Вариант реализации изобретения 4. Соединение варианта реализации изобретения 3, имеющее формула:



**[0513]** Вариант реализации изобретения 5. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 4, где  $R^5$  представляет собой замещенный или незамещенный алкил.

**[0514]** Вариант реализации изобретения 6. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 4, где  $R^5$  представляет собой незамещенный алкил.

**[0515]** Вариант реализации изобретения 7. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 4, где  $R^5$  представляет собой незамещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил.

**[0516]** Вариант реализации изобретения 8. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 4, где  $R^5$  представляет собой метил.

**[0517]** Вариант реализации изобретения 9. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 8, где  $R^6$  представляет собой незамещенный  $C_1$ - $C_4$  алкил.

**[0518]** Вариант реализации изобретения 10. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 8, где  $R^6$  представляет собой метил, этил, или пропил.

**[0519]** Вариант реализации изобретения 11. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 20, где  $R^6$  представляет собой метил.

**[0520]** Вариант реализации изобретения 12. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 11, где  $R^6$  присоединяется к углероду, имеющему (*R*) абсолютную стереохимию.

**[0521]** Вариант реализации изобретения 13. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 11, где  $R^6$  присоединяется к углероду, имеющему (*S*) абсолютную стереохимию.

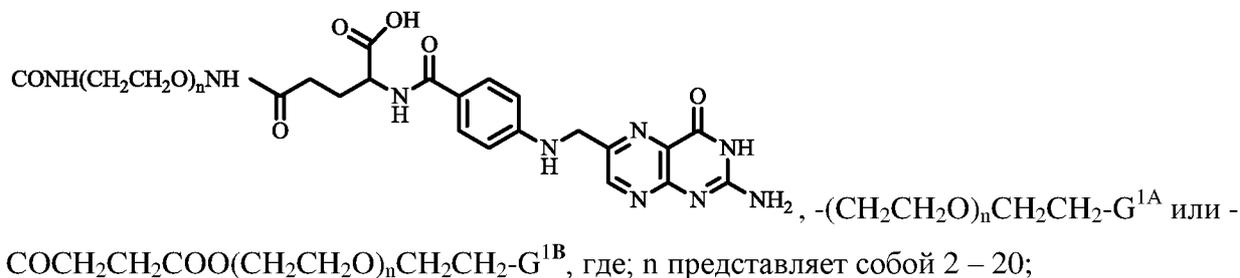
**[0522]** Вариант реализации изобретения 14. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 13, где  $R^4$  представляет собой водород или галоген.

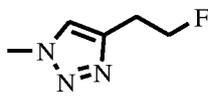
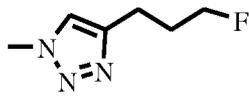
**[0523]** Вариант реализации изобретения 15. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 14, где  $R^1$  представляет собой водород, галоген,  $-OR^{1A}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

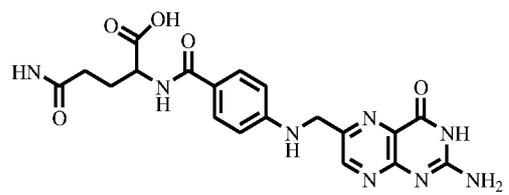
**[0524]** Вариант реализации изобретения 16. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 15, где  $R^1$  представляет собой  $-OR^{1A}$ , где  $R^{1A}$  представляет собой водород, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.

**[0525]** Вариант реализации изобретения 17. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 16, где  $R^{1A}$  представляет собой замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.

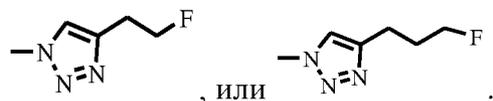
**[0526]** Вариант реализации изобретения 18. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 17, где  $R^{1A}$  представляет собой  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$ ,  $-C_3H_7$ ,  $-CD_3$ ,  $-CD_2CD_3$ ,  $-(CH_2)_2OH$ ,  $-(CH_2)_3OH$ ,  $-CH_2CH(OH)CH_3$ ,  $-(CH_2)_2CH(OH)CH_3$ ,  $-CH_2C(CH_3)_2OH$ ,  $-(CH_2)_2C(CH_3)_2OH$ ,  $-(CH_2)_2F$ ,  $-(CH_2)_3F$ ,  $-CH_2CH(F)CH_3$ ,  $-(CH_2)_2CH(F)CH_3$ ,  $-(CH_2)_2C(CH_3)_2F$ ,  $-(CH_2)_2Cl$ ,  $-(CH_2)_3Cl$ ,  $-CH_2CH(Cl)CH_3$ ,  $-(CH_2)_2CH(Cl)CH_3$ ,  $-CH_2C(CH_3)_2Cl$ ,  $-(CH_2)_2C(CH_3)_2Cl$ ,  $-(CH_2)_2NHSO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_3NHSO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_3N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2F)SO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2Cl)SO_2CH_3$ ,



$G^{1A}$  представляет собой H,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCF_3$ , F, Cl,  $-N_3$ ,  $-NHCH_2C_6H_4NO_2$ ,  $-NHCH_2C_6H_4F$ ,  $-NHCH_2C_6H_4NO_2$ ,  $-NHCH_2C_6H_4F$ , , или  ;



$G^{1B}$  представляет собой H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, F, Cl,



**[0527]** Вариант реализации изобретения 19. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 17, где  $R^{1A}$  представляет собой -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>F, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, где n равняется 2-5.

**[0528]** Вариант реализации изобретения 20. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 19, где Y представляет собой C(R<sup>8</sup>).

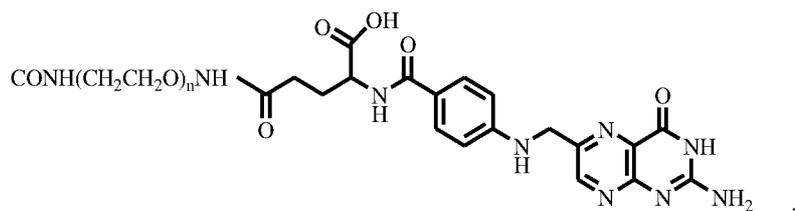
**[0529]** Вариант реализации изобретения 21. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 19, где Y представляет собой N.

**[0530]** Вариант реализации изобретения 22. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 21, где R<sup>8</sup> представляет собой водород, галоген, -OR<sup>8A</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

**[0531]** Вариант реализации изобретения 23. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 22, где R<sup>8</sup> представляет собой -OR<sup>8A</sup>, где R<sup>1A</sup> представляет собой водород, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.

**[0532]** Вариант реализации изобретения 24. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 23, где R<sup>8A</sup> представляет собой замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.

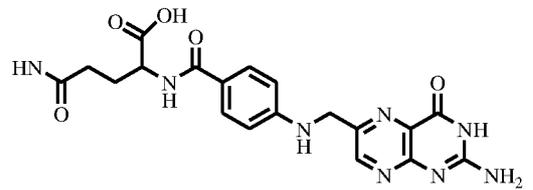
**[0533]** Вариант реализации изобретения 25. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 24, где R<sup>8A</sup> представляет собой -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CD<sub>3</sub>, -CD<sub>2</sub>CD<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>F, -



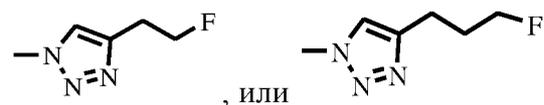
$\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{F}$ ,  $-(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{F}$ ,

$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-G}^{8\text{A}}$ , или  $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-G}^{8\text{B}}$ , где,  $n$  равняется 2–20;  $\text{G}^{8\text{A}}$  представляет собой  $\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{OCF}_3$ ,  $\text{F}$ ,  $\text{Cl}$ ,  $\text{N}_3$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$ ,  $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$ ,

, или ;  $\text{G}^{8\text{B}}$



представляет собой  $\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $\text{F}$ ,  $\text{Cl}$ ,



**[0534]** Вариант реализации изобретения 26. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 24, где  $\text{R}^{8\text{A}}$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_2\text{F}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{F}$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{F}$ , или  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ , где  $n$  представляет собой 2 - 5.

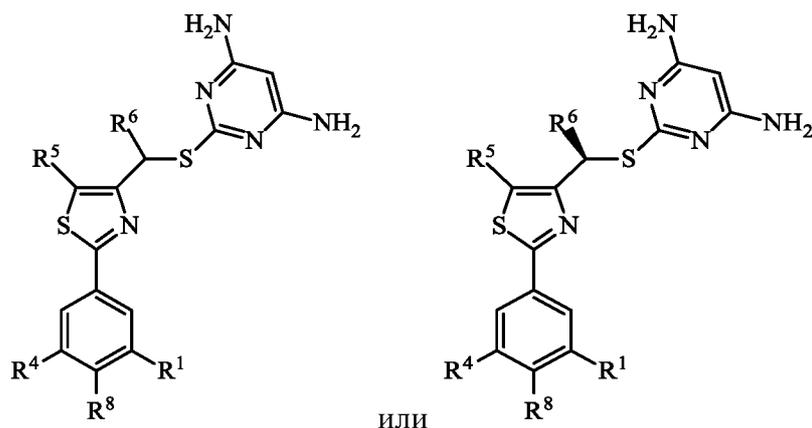
**[0535]** Вариант реализации изобретения 27. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 26, где  $\text{Z}$  представляет собой  $\text{C}(\text{R}^9)$ .

**[0536]** Вариант реализации изобретения 28. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 27, где  $\text{R}^9$  независимо представляет собой водород.

**[0537]** Вариант реализации изобретения 29. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 27, где  $\text{Z}$  представляет собой  $\text{N}$ .

**[0538]** Вариант реализации изобретения 30. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 - 29, где  $\text{X}$  представляет собой  $\text{S}$ .

**[0539]** Вариант реализации изобретения 31. Соединение по любому из вариантов реализации изобретения 1 – 30, имеющее формулу:



**[0540]** Вариант реализации изобретения 32. Соединение варианта реализации изобретения 31, где:  $R^1$  представляет собой  $OR^{1A}$ , где  $R^{1A}$  представляет собой  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$ ,  $-O(CH_2)_2F$ ,  $-(CH_2)_2NHSO_2CH_3$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nF$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nCH_3$ , где  $n$  представляет собой 2 - 5;  $R^4$  представляет собой водород или галоген;  $R^5$  представляет собой метил или пропил;  $R^6$  представляет собой метил; и  $R^8$  представляет собой  $-OR^{8A}$ , где  $R^{8A}$  представляет собой  $-(CH_2)_2NHSO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_2F$ ,  $(CH_2)_3F$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nF$ , или  $-(CH_2CH_2O)_nCH_3$ , где  $n$  представляет собой 2 - 5.

**[0541]** Вариант реализации изобретения 33. Фармацевтический препарат, включающий соединение по одному из вариантов реализации изобретения 1 - 32 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

**[0542]** Вариант реализации изобретения 34. Способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, где указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества соединения по одному из вариантов реализации изобретения 1 - 32.

**[0543]** Вариант реализации изобретения 35. Способ варианта реализации изобретения 34, где указанный рак представляет собой лейкоз, лимфому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак легкого, глиобластому, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак предстательной железы, или рак головы и шеи.

**[0544]** Вариант реализации изобретения 36. Способ варианта реализации изобретения 34, где указанный рак представляет собой лейкоз или лимфому.

**[0545]** Вариант реализации изобретения 37. Способ варианта реализации изобретения 34, где указанный рак представляет собой рак яичников, рак поджелудочной железы, рак

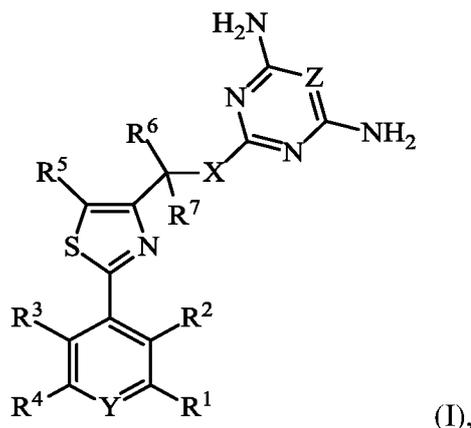
легкого, глиобластомы, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак предстательной железы, или рак головы и шеи.

**[0546]** Вариант реализации изобретения 38. Способ ингибирования дезоксицитидинкиназы, где способ включает контактирование дезоксицитидинкиназы с эффективным количеством соединения по одному из вариантов реализации изобретения 1 – 34, тем самым, ингибируя указанную дезоксицитидинкиназу.

**[0547]** Вариант реализации изобретения 39. Способ варианта реализации изобретения 38, где указанное контактирование выполняют *in vitro*.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее формулу:



где:

Y представляет собой C(R<sup>8</sup>) или N;

Z представляет собой C(R<sup>9</sup>) или N;

X представляет собой CH<sub>2</sub>, O, N(R<sup>10</sup>), S, S(O) или S(O)<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>1A</sup>, -OR<sup>1A</sup>, -NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -C(O)OR<sup>1A</sup>, -C(O)NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>R<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>OR<sup>1A</sup>, -S(O)<sub>n1</sub>NR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NHNR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -ONR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, -NHC(O)NHNR<sup>1A</sup>R<sup>1B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил;

R<sup>2</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>2A</sup>, -OR<sup>2A</sup>, -NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -C(O)OR<sup>2A</sup>, -C(O)NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>R<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>OR<sup>2A</sup>, -S(O)<sub>n2</sub>NR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NHNR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -ONR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, -NHC(O)NHNR<sup>2A</sup>R<sup>2B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил;

R<sup>3</sup> представляет собой водород, галоген, -N<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -CCl<sub>3</sub>, -CBr<sub>3</sub>, -Cl<sub>3</sub>, -CN, -COR<sup>3A</sup>, -OR<sup>3A</sup>, -NR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -C(O)OR<sup>3A</sup>, -C(O)NR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -NO<sub>2</sub>, -SR<sup>3A</sup>, -S(O)<sub>n3</sub>R<sup>3A</sup>, -S(O)<sub>n3</sub>OR<sup>3A</sup>, -S(O)<sub>n3</sub>NR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -NHNR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -ONR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, -NHC(O)NHNR<sup>3A</sup>R<sup>3B</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или

незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил;

$R^4$  представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{4A}$ ,  $-OR^{4A}$ ,  $-NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-C(O)OR^{4A}$ ,  $-C(O)NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}R^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}OR^{4A}$ ,  $-S(O)_{n4}NR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NHN R^{4A}R^{4B}$ ,  $-ONR^{4A}R^{4B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{4A}R^{4B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил;

$R^5$  независимо представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{5A}$ ,  $-OR^{5A}$ ,  $-NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-C(O)OR^{5A}$ ,  $-C(O)NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}R^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}OR^{5A}$ ,  $-S(O)_{n5}NR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NHN R^{5A}R^{5B}$ ,  $-ONR^{5A}R^{5B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{5A}R^{5B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил, где  $R^5$  и  $R^6$  необязательно объединяются с образованием замещенного или незамещенного циклоалкила;

$R^6$  представляет собой незамещенный  $C_1$ - $C_6$  алкил;

$R^7$  представляет собой H, D, F или  $-CH_3$ ;

$R^8$  представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{8A}$ ,  $-OR^{8A}$ ,  $-NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-C(O)OR^{8A}$ ,  $-C(O)NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{8A}$ ,  $-S(O)_{n8}R^{8A}$ ,  $-S(O)_{n8}OR^{8A}$ ,  $-S(O)_{n8}NR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NHN R^{8A}R^{8B}$ ,  $-ONR^{8A}R^{8B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{8A}R^{8B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил;

$R^9$  представляет собой водород, галоген,  $-N_3$ ,  $-CF_3$ ,  $-CCl_3$ ,  $-CBr_3$ ,  $-Cl_3$ ,  $-CN$ ,  $-COR^{9A}$ ,  $-OR^{9A}$ ,  $-NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-C(O)OR^{9A}$ ,  $-C(O)NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NO_2$ ,  $-SR^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}R^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}OR^{9A}$ ,  $-S(O)_{n9}NR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NHN R^{9A}R^{9B}$ ,  $-ONR^{9A}R^{9B}$ ,  $-NHC(O)NHN R^{9A}R^{9B}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил;

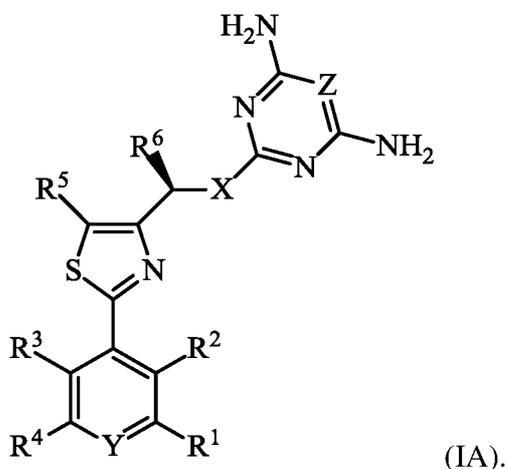
$R^{10}$  представляет собой H,  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$ ,  $-C_3H_7$ ,  $-CH_2C_6H_5$ ;

$R^{1A}$ ,  $R^{1B}$ ,  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{8A}$ ,  $R^{8B}$ ,  $R^{9A}$ , и  $R^{9B}$  независимо представляют собой водород, оксо, галоген,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-NO_2$ , -

SH,  $-S(O)_2Cl$ ,  $-S(O)_3H$ ,  $-S(O)_4H$ ,  $-S(O)_2NH_2$ ,  $-NHNH_2$ ,  $-ONH_2$ ,  $-NHC(O)NHNH_2$ ,  $-NHC(O)NH_2$ ,  $-NHS(O)_2H$ ,  $-NHC(O)H$ ,  $-NHC(O)-OH$ ,  $-NHOH$ ,  $-OCF_3$ ,  $-OCHF_2$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил; и

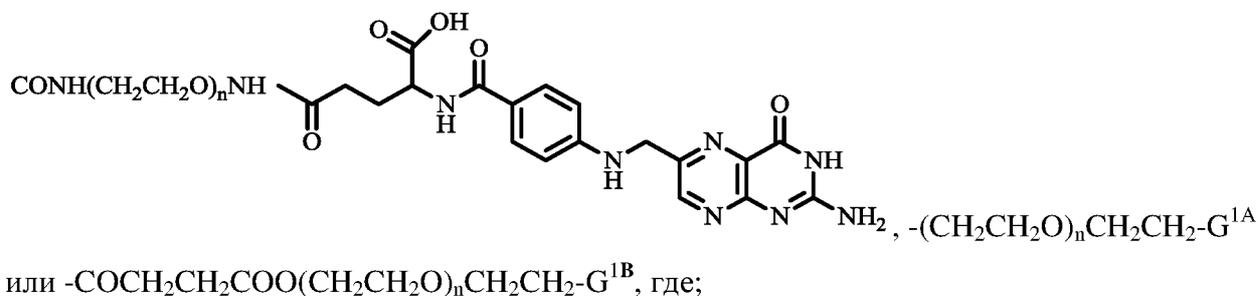
n1, n2, n3, n4, n5, n8, и n9 независимо представляют собой 1, 2, или 3.

2. Соединение по п. 1, где  $R^2$  и  $R^3$  представляют собой водород.
3. Соединение по любому из пп. 1 -2, где  $R^7$  представляет собой водород.
4. Соединение по п. 3, имеющее формулу:



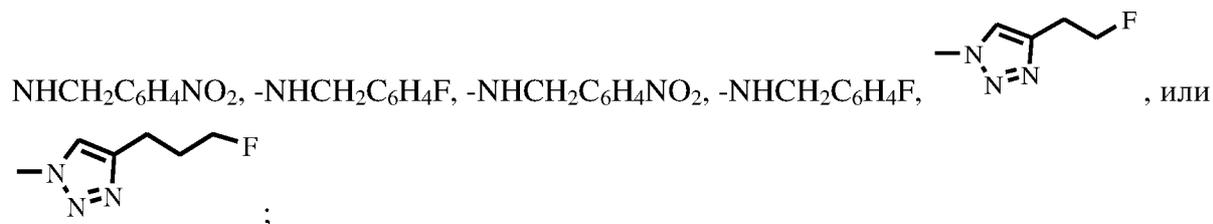
5. Соединение по любому из пп. 1 - 4, где  $R^5$  представляет собой замещенный или незамещенный алкил.
6. Соединение по любому из пп. 1 - 4, где  $R^5$  представляет собой незамещенный алкил.
7. Соединение по любому из пп. 1 - 4, где  $R^5$  представляет собой незамещенный  $C_1-C_6$  алкил.
8. Соединение по любому из пп. 1 - 4, где  $R^5$  представляет собой метил.
9. Соединение по любому из пп. 1 - 8, где  $R^6$  представляет собой незамещенный  $C_1-C_4$  алкил.
10. Соединение по любому из пп. 1 - 8, где  $R^6$  представляет собой метил, этил или пропил.

11. Соединение по любому из пп. 1 - 10, где  $R^6$  представляет собой метил.
12. Соединение по любому из пп. 1 - 11, где  $R^6$  присоединяется к углероду, имеющему (*R*) абсолютную стереохимию.
13. Соединение по любому из пп. 1 - 11, где  $R^6$  присоединяется к углероду, имеющему (*S*) абсолютную стереохимию.
14. Соединение по любому из пп. 1 - 13, где  $R^4$  представляет собой водород или галоген.
15. Соединение по любому из пп. 1 - 14, где  $R^1$  представляет собой водород, галоген,  $-OR^{1A}$ , замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.
16. Соединение по любому из пп. 1 - 15, где  $R^1$  представляет собой  $-OR^{1A}$ , где  $R^{1A}$  представляет собой водород, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.
17. Соединение по любому из пп. 1 - 16, где  $R^{1A}$  представляет собой замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.
18. Соединение по любому из пп. 1 - 17, где  $R^{1A}$  представляет собой  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$ ,  $-C_3H_7$ ,  $-CD_3$ ,  $-CD_2CD_3$ ,  $-(CH_2)_2OH$ ,  $-(CH_2)_3OH$ ,  $-CH_2CH(OH)CH_3$ ,  $-(CH_2)_2CH(OH)CH_3$ ,  $-CH_2C(CH_3)_2OH$ ,  $-(CH_2)_2C(CH_3)_2OH$ ,  $-(CH_2)_2F$ ,  $-(CH_2)_3F$ ,  $-CH_2CH(F)CH_3$ ,  $-(CH_2)_2CH(F)CH_3$ ,  $-(CH_2)_2C(CH_3)_2F$ ,  $-(CH_2)_2Cl$ ,  $-(CH_2)_3Cl$ ,  $-CH_2CH(Cl)CH_3$ ,  $-(CH_2)_2CH(Cl)CH_3$ ,  $-CH_2C(CH_3)_2Cl$ ,  $-(CH_2)_2C(CH_3)_2Cl$ ,  $-(CH_2)_2NHSO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_3NHSO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_3N(CH_2CH_2OH)SO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2F)SO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_2N(CH_2CH_2Cl)SO_2CH_3$ ,

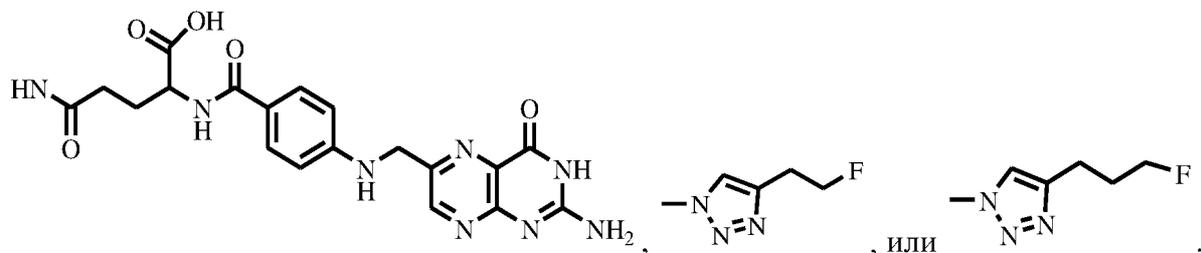


*n* представляет собой 2 – 20;

$G^{1A}$  представляет собой H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, F, Cl, -N<sub>3</sub>, -



$G^{1B}$  представляет собой H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, F, Cl,



19. Соединение по любому из пп. 1 - 17, где  $R^{1A}$  представляет собой -OCH<sub>3</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>F, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, где n представляет собой 2 - 5.

20. Соединение по любому из пп. 1 - 19, где Y представляет собой C(R<sup>8</sup>).

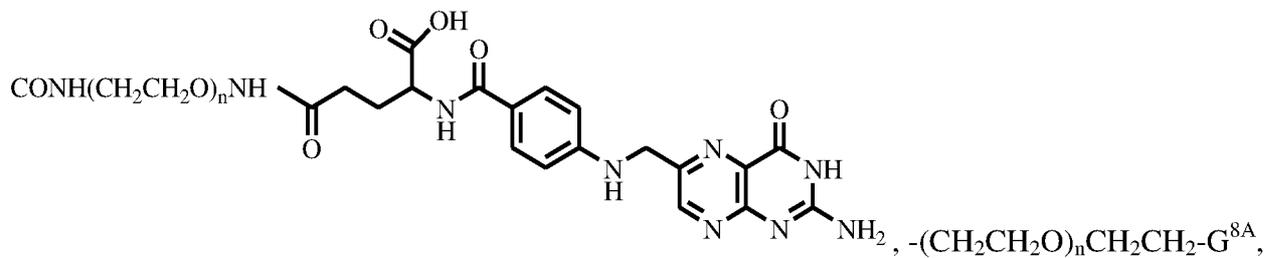
21. Соединение по любому из пп. 1 - 19, где Y представляет собой N

22. Соединение по любому из пп. 1 - 21, где R<sup>8</sup> представляет собой водород, галоген, -OR<sup>8A</sup>, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный гетероалкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкил, замещенный или незамещенный арил, или замещенный или незамещенный гетероарил.

23. Соединение по любому из пп. 1 - 22, где R<sup>8</sup> представляет собой -OR<sup>8A</sup>, где R<sup>1A</sup> представляет собой водород, замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.

24. Соединение по любому из пп. 1 - 23, где R<sup>8A</sup> представляет собой замещенный или незамещенный алкил, или замещенный или незамещенный гетероалкил.

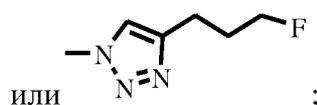
25. Соединение по любому из пп. 1 - 24, где R<sup>8A</sup> представляет собой -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CD<sub>3</sub>, -CD<sub>2</sub>CD<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>F, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>F,



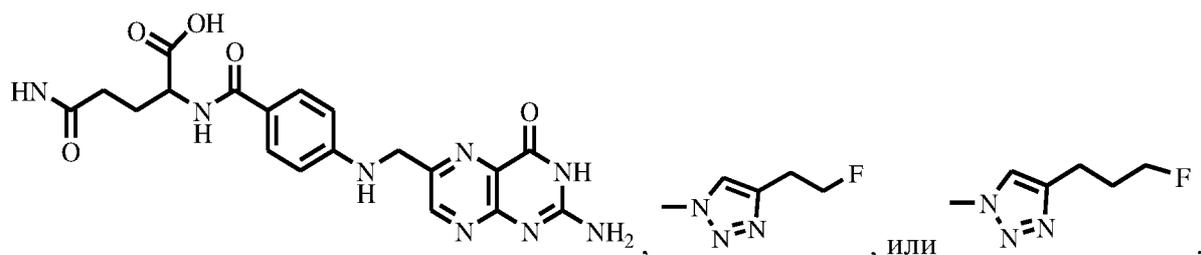
или  $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-G}^{8B}$ , где,

$n$  представляет собой 2 – 20;

$\text{G}^{8A}$  представляет собой H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, F, Cl, N<sub>3</sub>, -



$\text{G}^{8B}$  представляет собой H, -OH, -NH<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, F, Cl,



26. Соединение по любому из пп. 1 - 24, где  $\text{R}^{8A}$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_2\text{NH}\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_2\text{F}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{F}$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{F}$ , или  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$ , где  $n$  равняется 2-5.

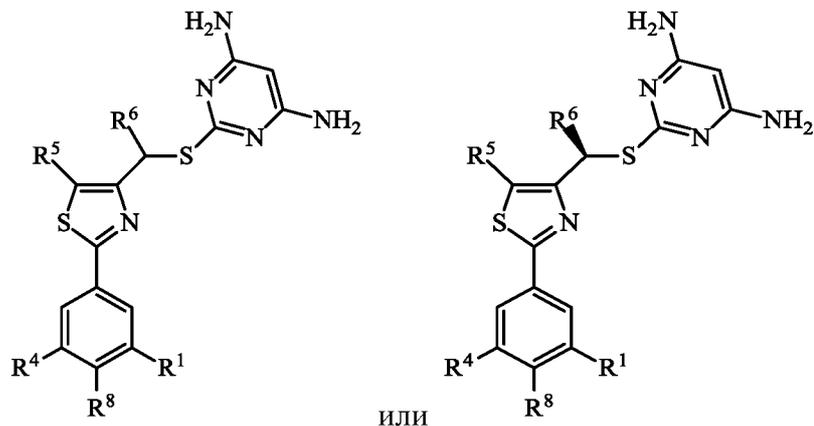
27. Соединение по любому из пп. 1 - 26, где  $Z$  представляет собой  $\text{C}(\text{R}^9)$ .

28. Соединение по любому из пп. 1 - 27, где  $\text{R}^9$  независимо представляет собой водород.

29. Соединение по любому из пп. 1 - 27, где  $Z$  представляет собой N.

30. Соединение по любому из пп. 1 - 29, где  $X$  представляет собой S.

31. Соединение по любому из пп. 1 - 30, имеющее формулу:



32. Соединение по п. 31, где:

$R^1$  представляет собой  $OR^{1A}$ , где  $R^{1A}$  представляет собой  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$ ,  $-O(CH_2)_2F$ ,  $-(CH_2)_2NHSO_2CH_3$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nF$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nCH_3$ , где  $n$  представляет собой 2 - 5;

$R^4$  представляет собой водород или галоген;

$R^5$  представляет собой метил или пропил;

$R^6$  представляет собой метил; и

$R^8$  представляет собой  $-OR^{8A}$ , где  $R^{8A}$  представляет собой  $-(CH_2)_2NHSO_2CH_3$ ,  $-(CH_2)_2F$ ,  $(CH_2)_3F$ ,  $-(CH_2CH_2O)_nF$ , или  $-(CH_2CH_2O)_nCH_3$ , где  $n$  представляет собой 2 - 5.

33. Фармацевтический препарат включающий соединение по одному из пп. 1-34 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

34. Способ лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, причем указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества соединения по одному из пп. 1-32.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой лейкоз, лимфому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак легкого, глиобластому, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак предстательной железы или рак головы и шеи.

36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой лейкоз или лимфому.

37. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак яичников, рак поджелудочной железы, рак легкого, глиобластому, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак предстательной железы или рак головы и шеи.

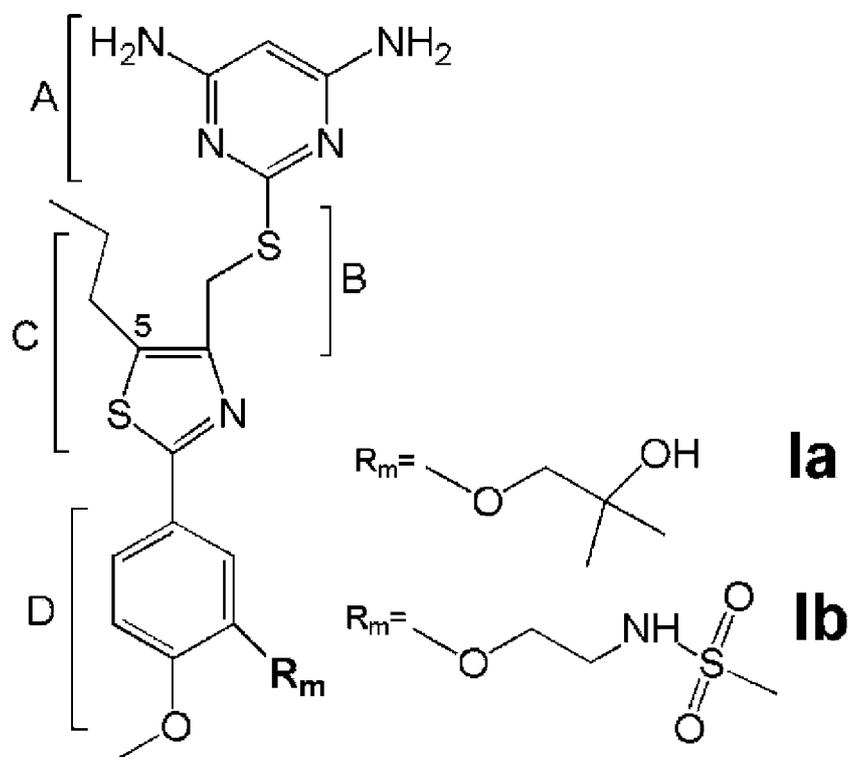
38. Способ ингибирования дезоксицитидинкиназы, причем способ включает контактирование дезоксицитидинкиназы с эффективным количеством соединения по одному из пп. 1-34, тем самым, ингибируя указанную дезоксицитидинкиназу.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что указанное контактирование выполняется *in vitro*.

По доверенности

Фигура 1

А

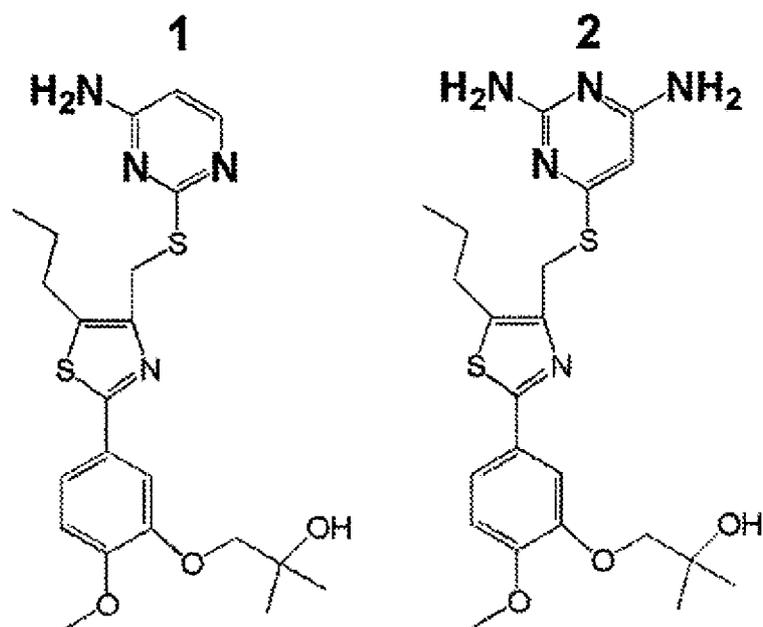


В

Соединение	Стационарная кинетика		СЕМ клетки
	$IC_{50}^{app}$ (нМ)	$K_i^{app}$ (нМ)	$IC_{50}$ (нМ)
<b>la</b>	$14.5 \pm 2.8$	$0.8 \pm 0.7$	1.4
<b>lb</b>	$14.1 \pm 3.0$	$0.5 \pm 0.5$	4.9

Фигура 2

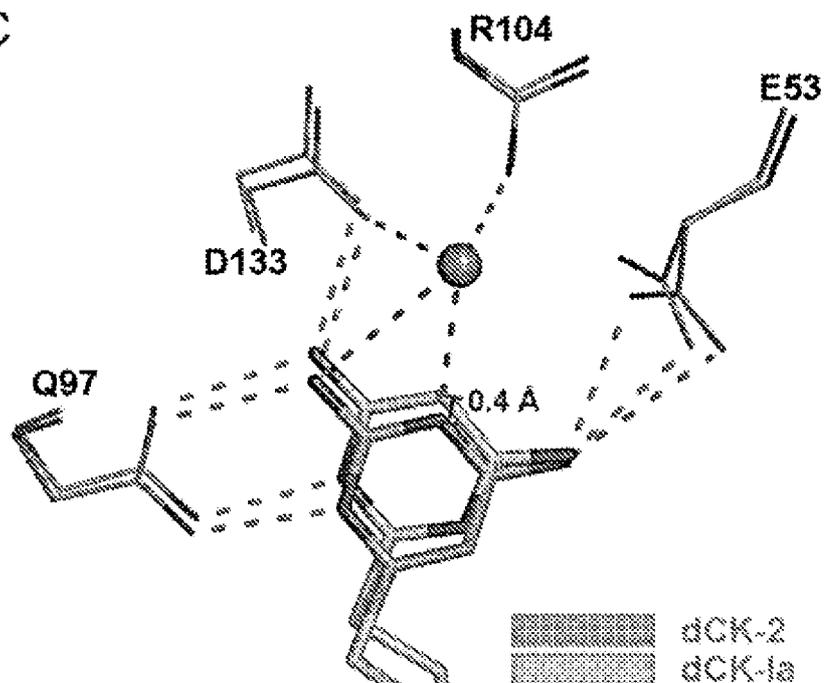
A



B

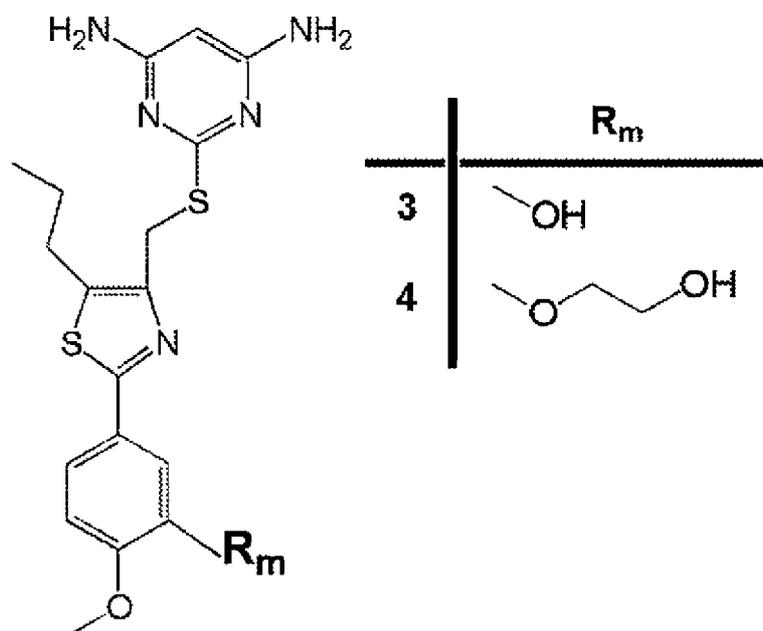
Соединение	Стационарная кинетика		СЕМ клетки
	$IC_{50}^{app}$ (нМ)	$K_i^{app}$ (нМ)	$IC_{50}$ (нМ)
<b>1</b>	$11.2 \pm 1.1$	$1.8 \pm 1.7$	21.8
<b>2</b>	$754 \pm 58$	$735 \pm 55$	Н.У.

C



Фигура 3

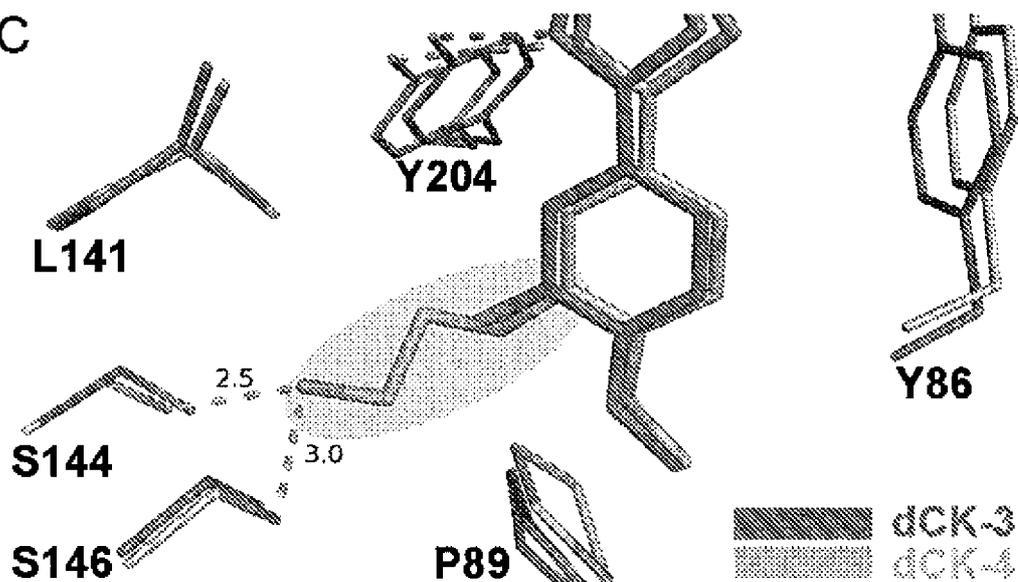
A



B

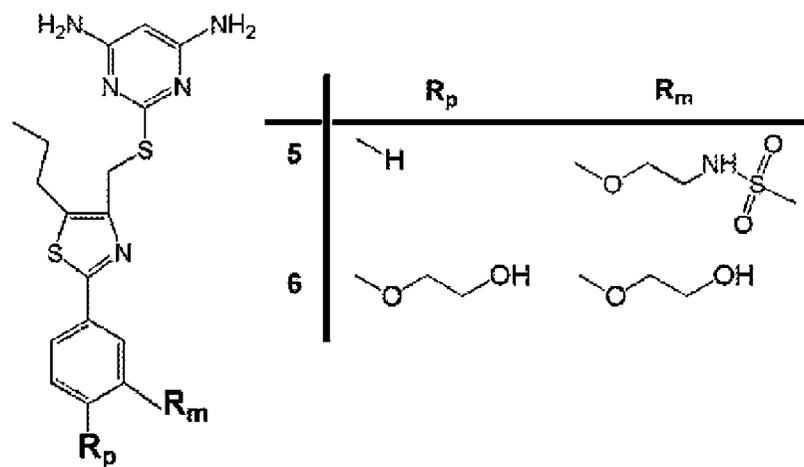
Соединение	Стационарная кинетика		СЕМ клетки
	$\text{IC}_{50}^{\text{app}}$ (нМ)	$\text{K}_i^{\text{app}}$ (нМ)	$\text{IC}_{50}$ (нМ)
<b>3</b>	$26.1 \pm 4.0$	$8.9 \pm 0.9$	18.6
<b>4</b>	$14.6 \pm 3.6$	$0.5 \pm 0.4$	1.15

C



Фигура 4

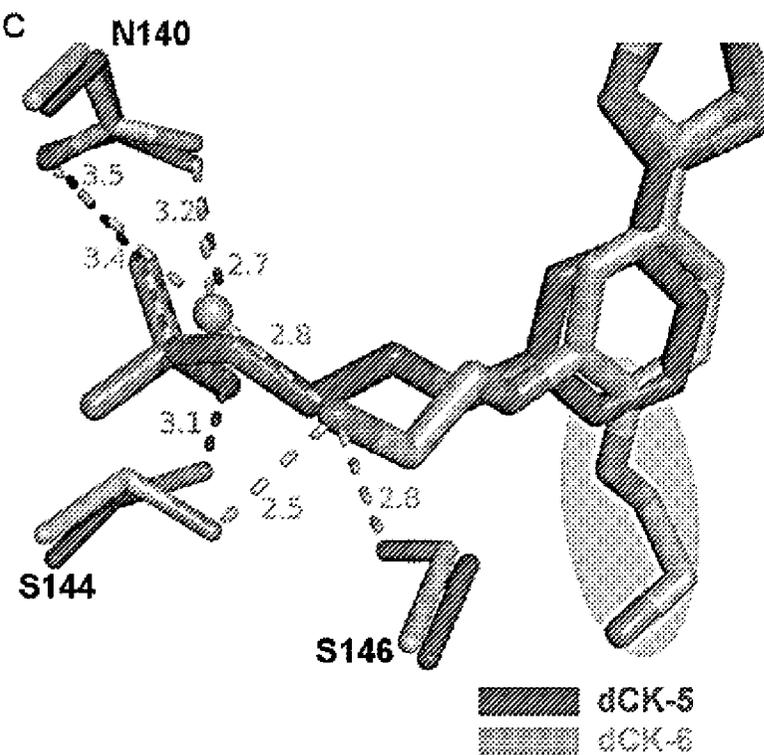
A



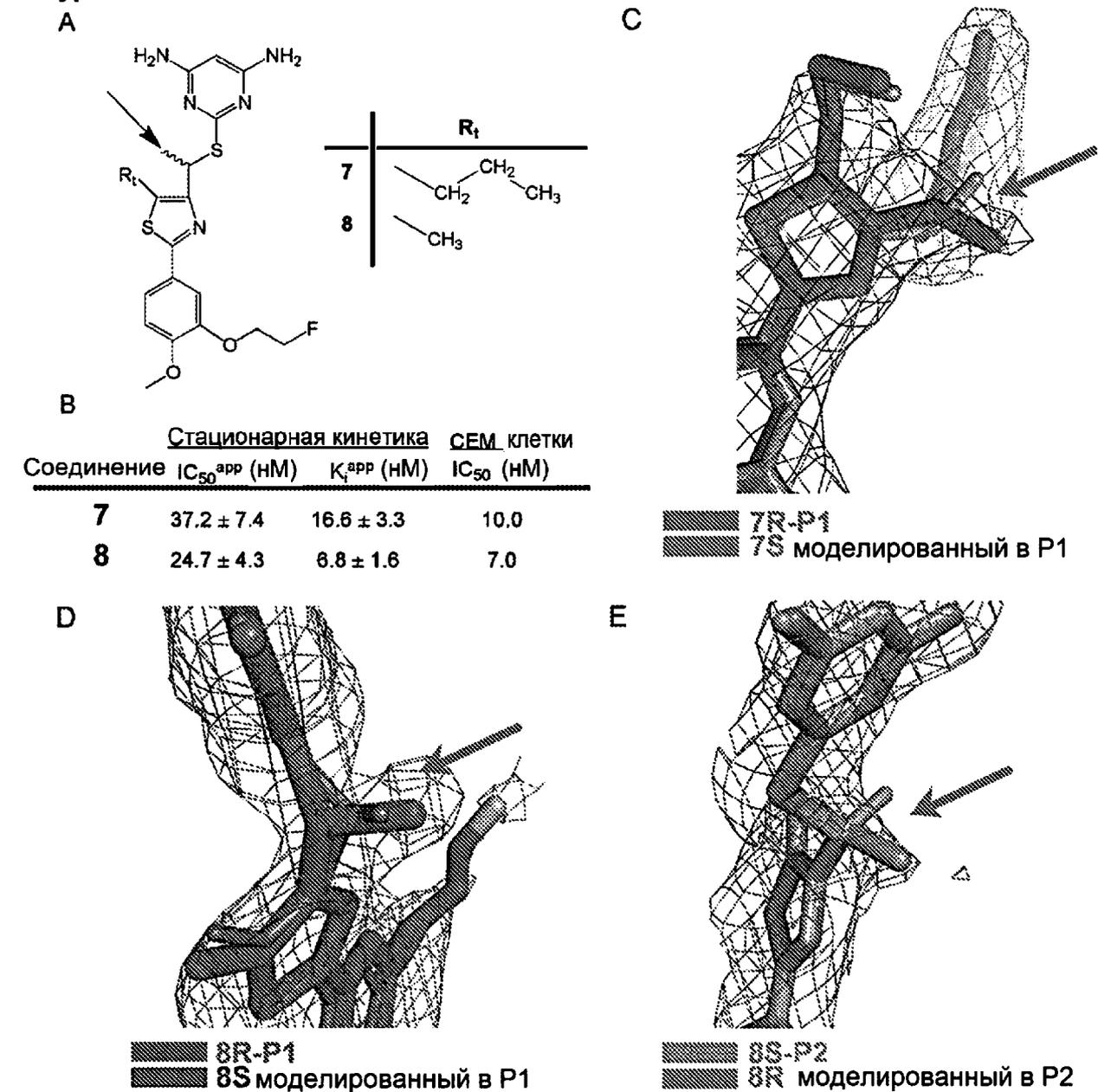
B

Соединение	Стационарная кинетика		СЕМ КЛЕТКИ $IC_{50}$ (нМ)
	$IC_{50}^{app}$ (нМ)	$K_i^{app}$ (нМ)	
<b>5</b>	$16.8 \pm 3.2$	$1.9 \pm 0.4$	11.6
<b>6</b>	$17.9 \pm 4.4$	$2.0 \pm 0.6$	0.9

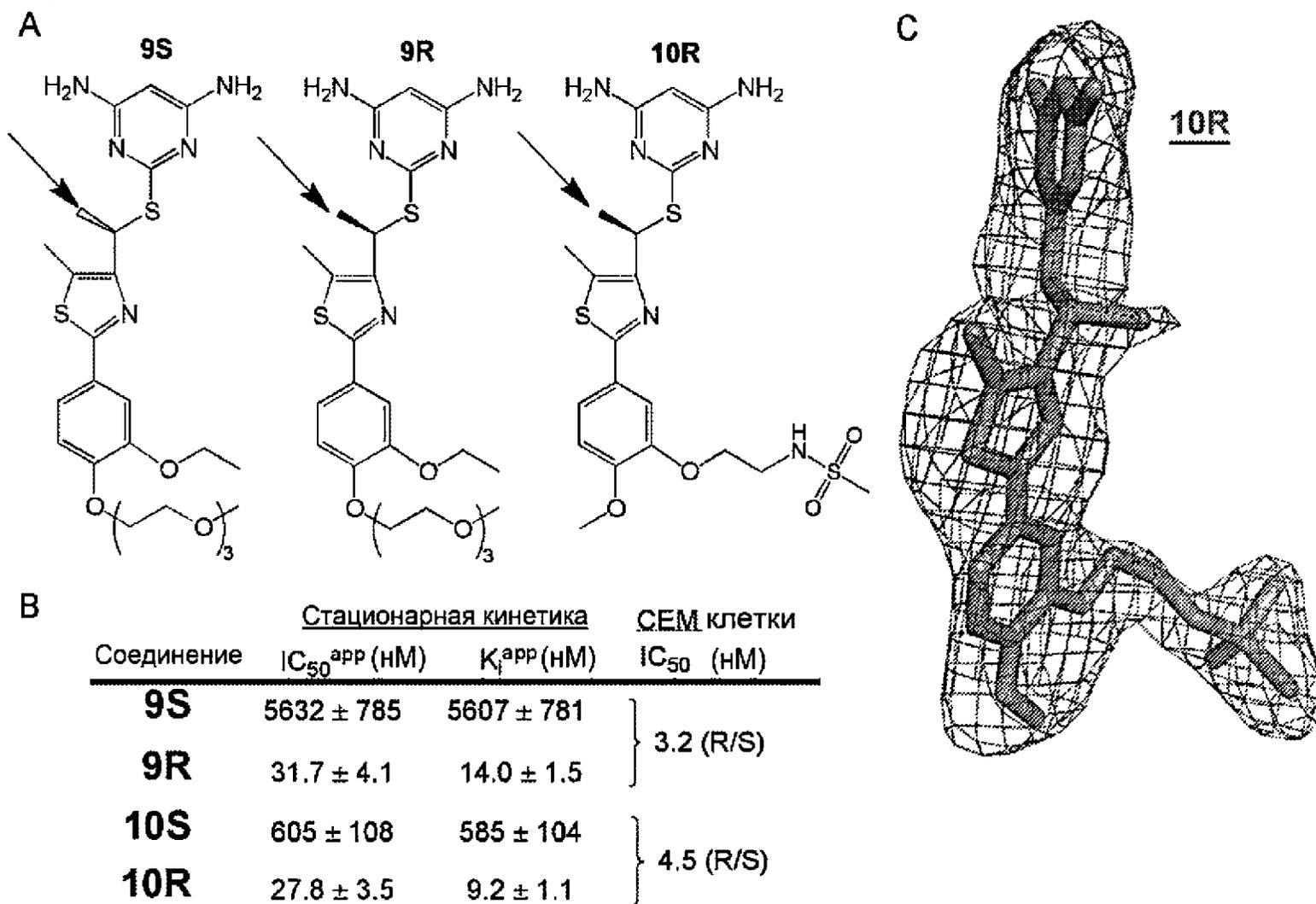
C



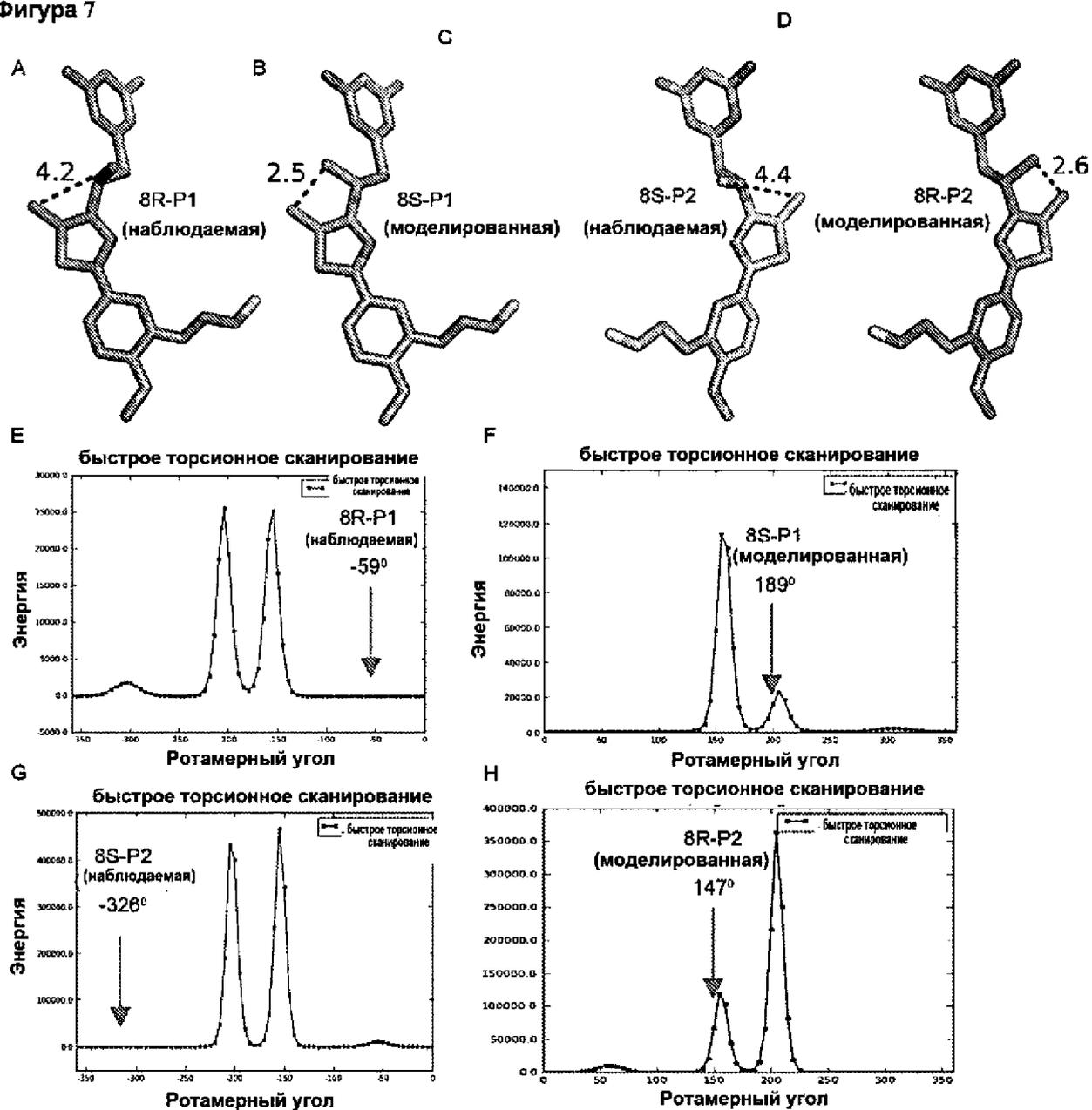
Фигура 5



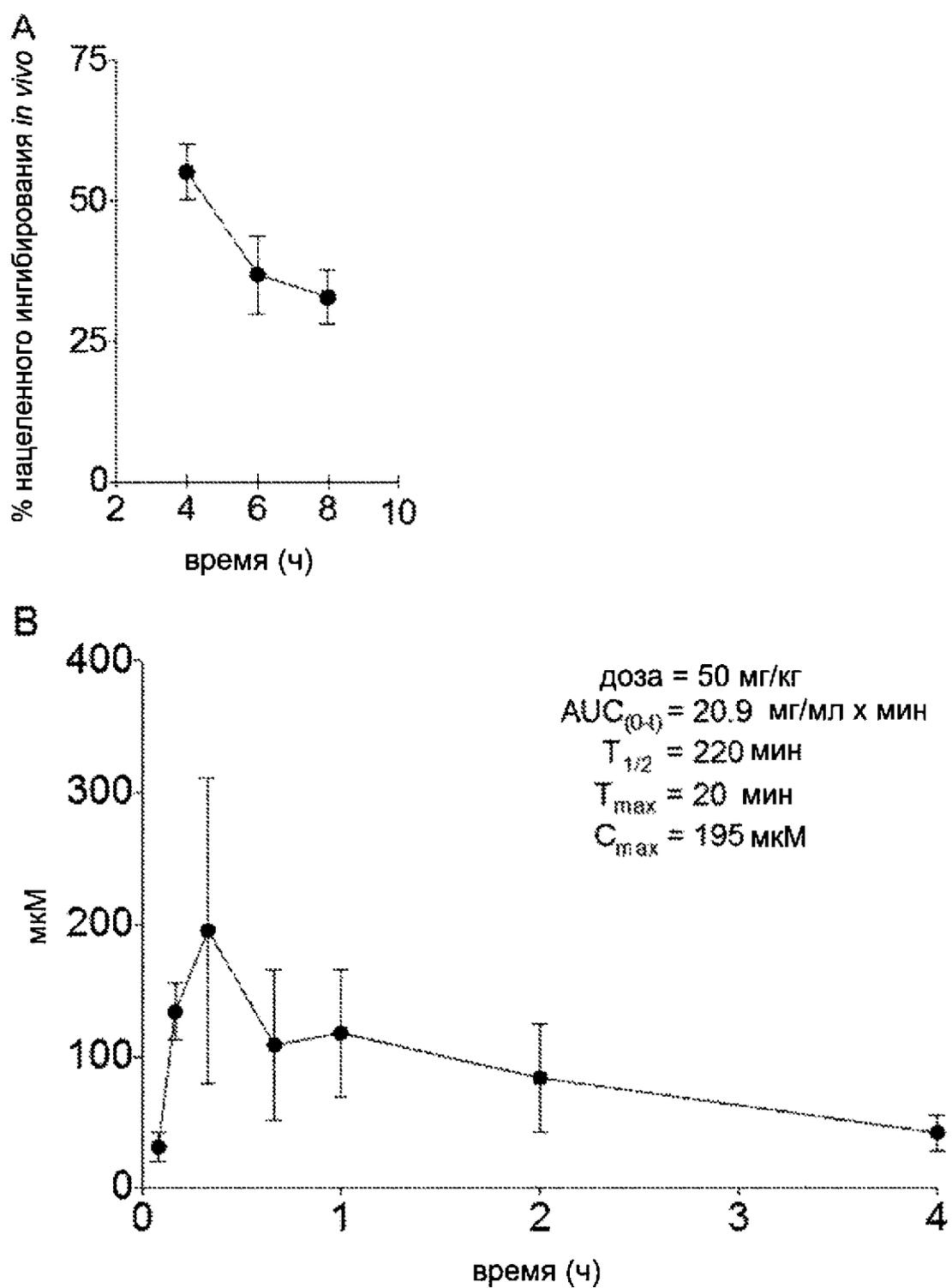
Фигура 6



Фигура 7

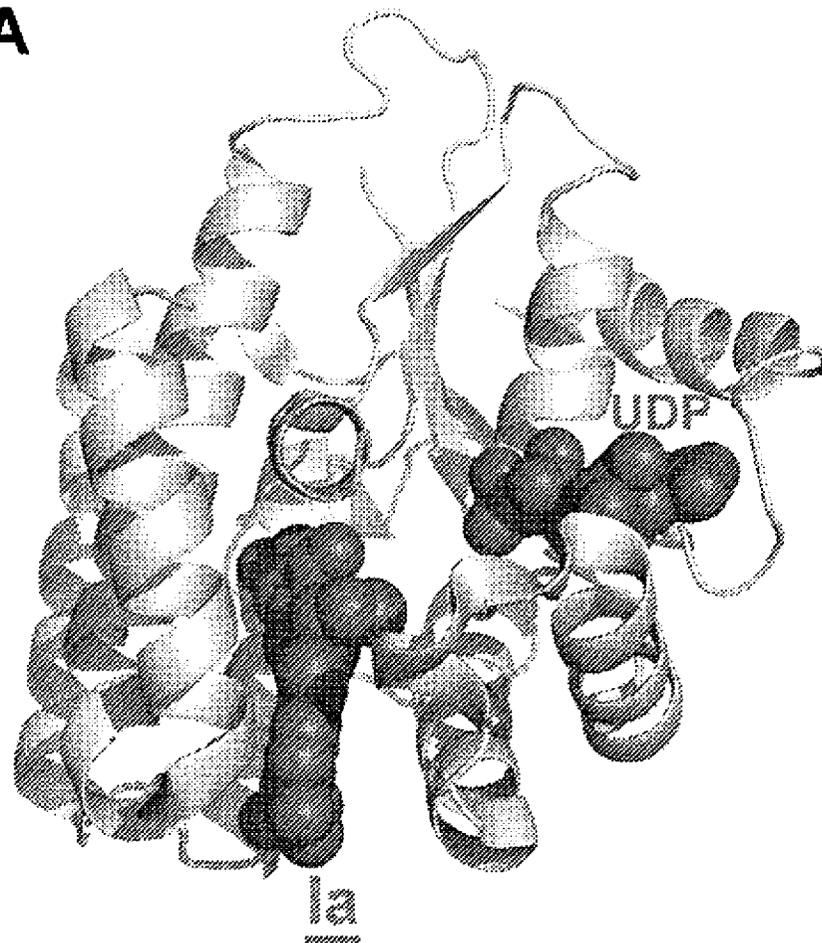


Фигура 8

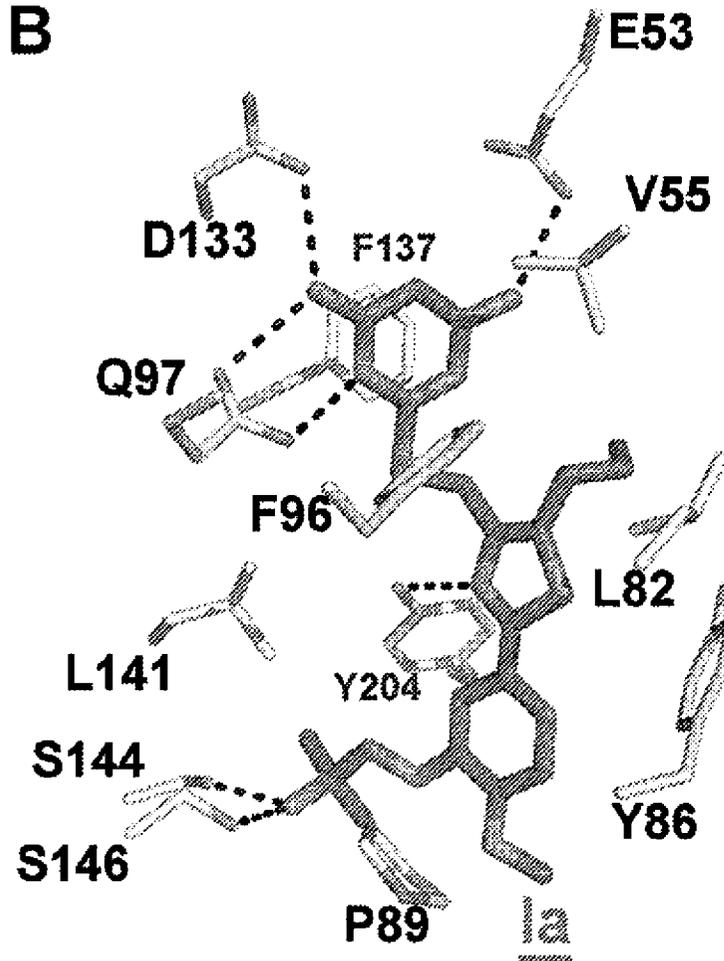


Фигура 9

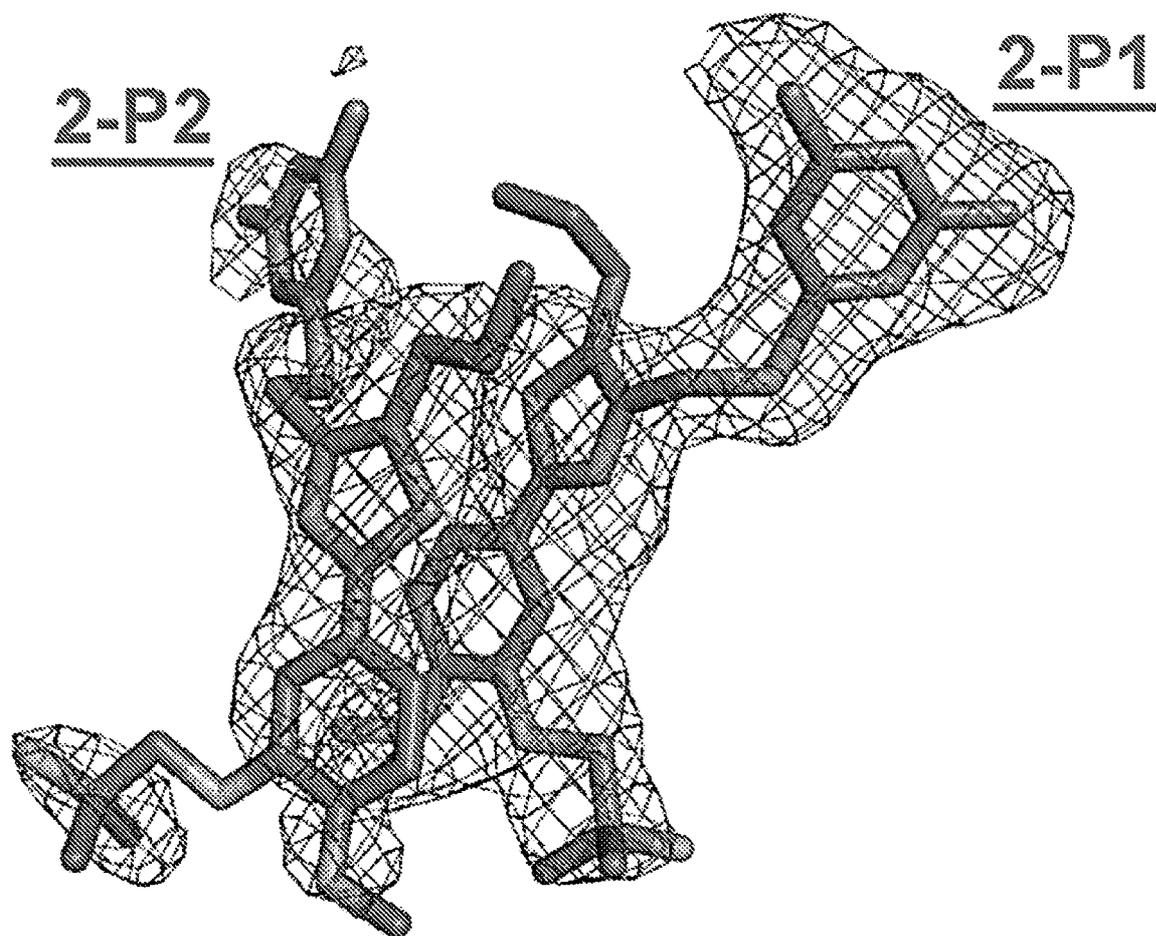
**A**



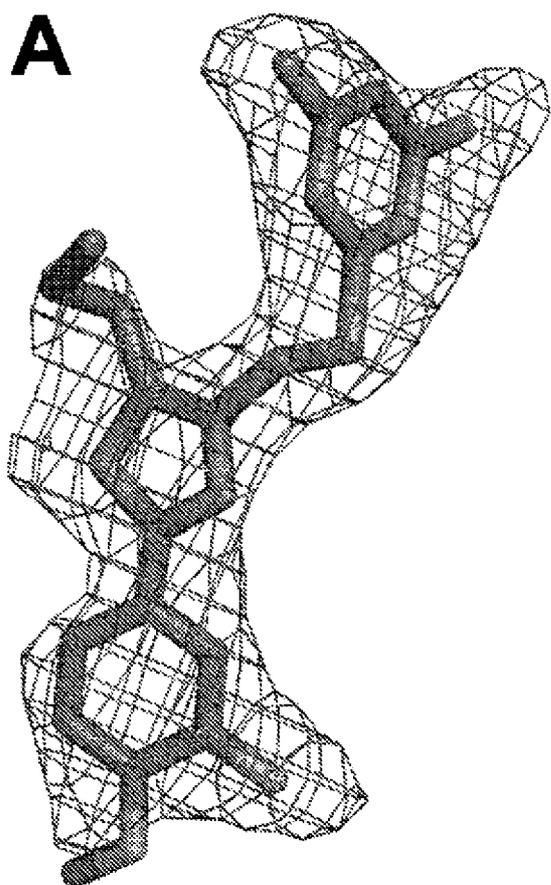
**B**



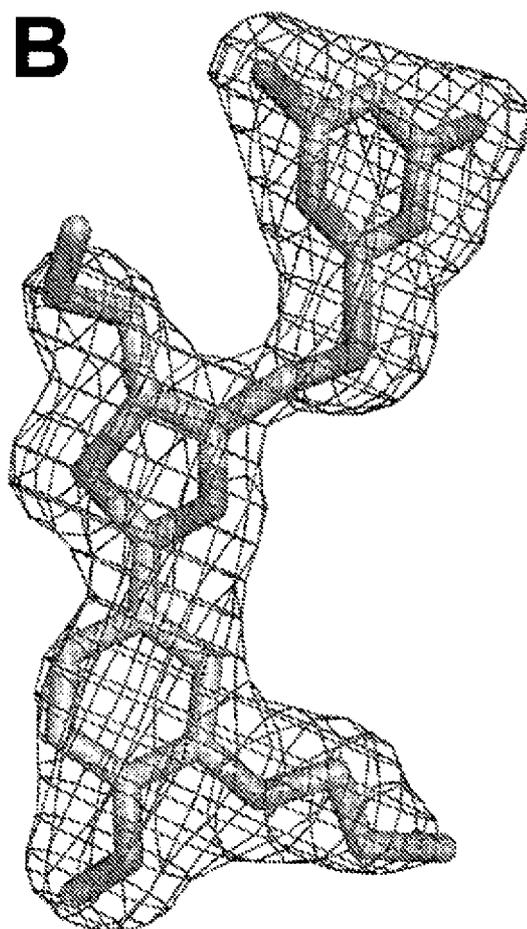
Фигура 10



Фигура 11

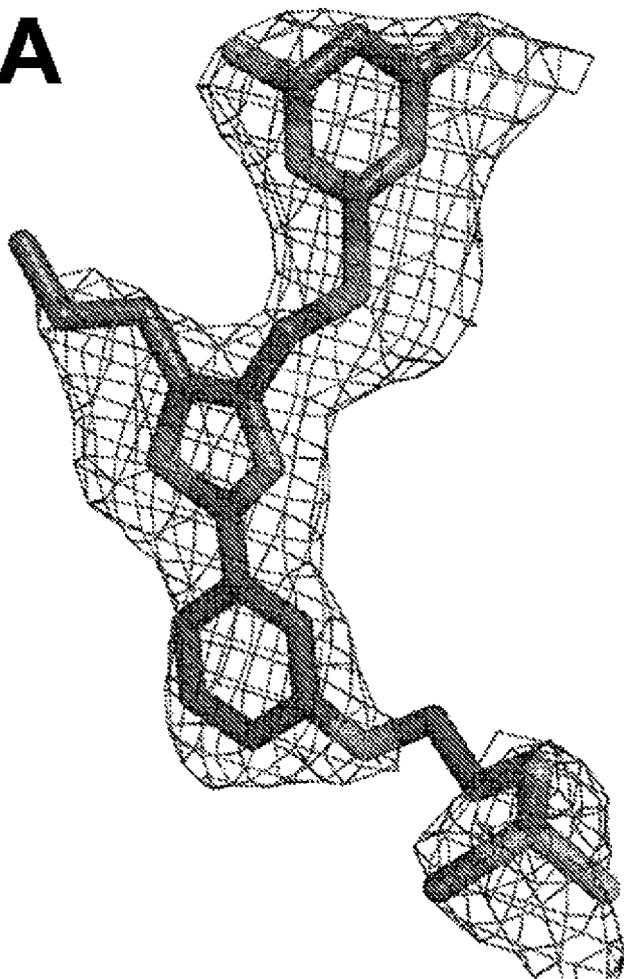
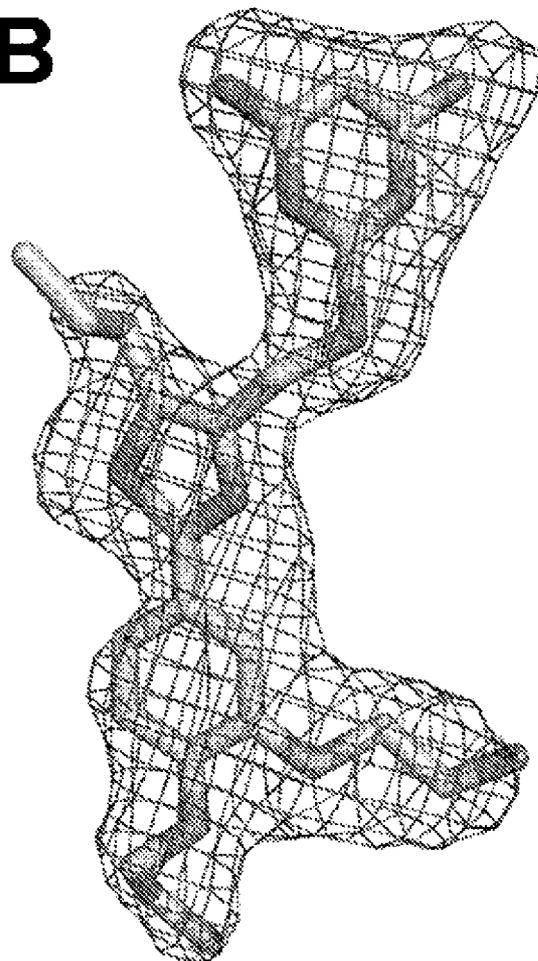


Соединение 3

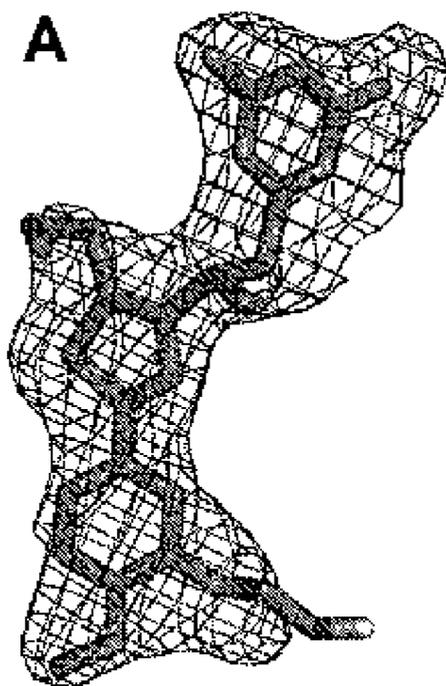


Соединение 4

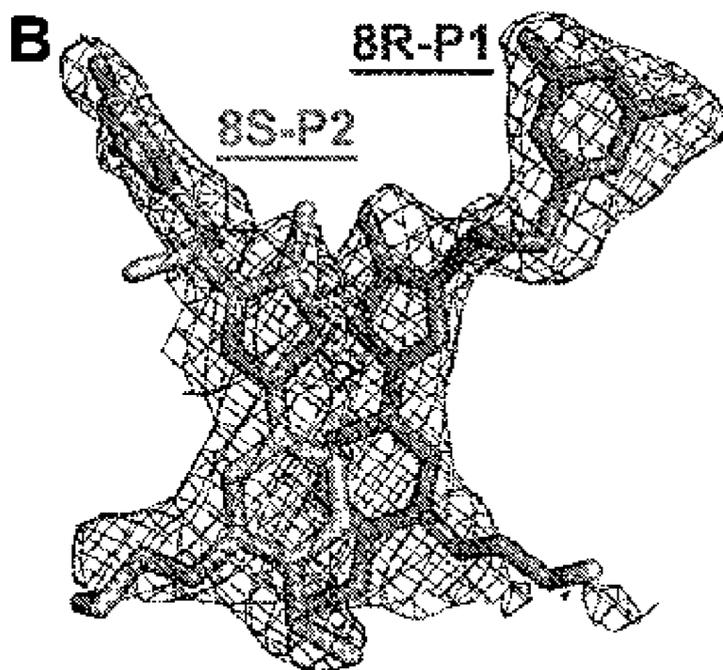
Фигура 12

**A****Соединение 5****B****Соединение 6**

Фигура 13

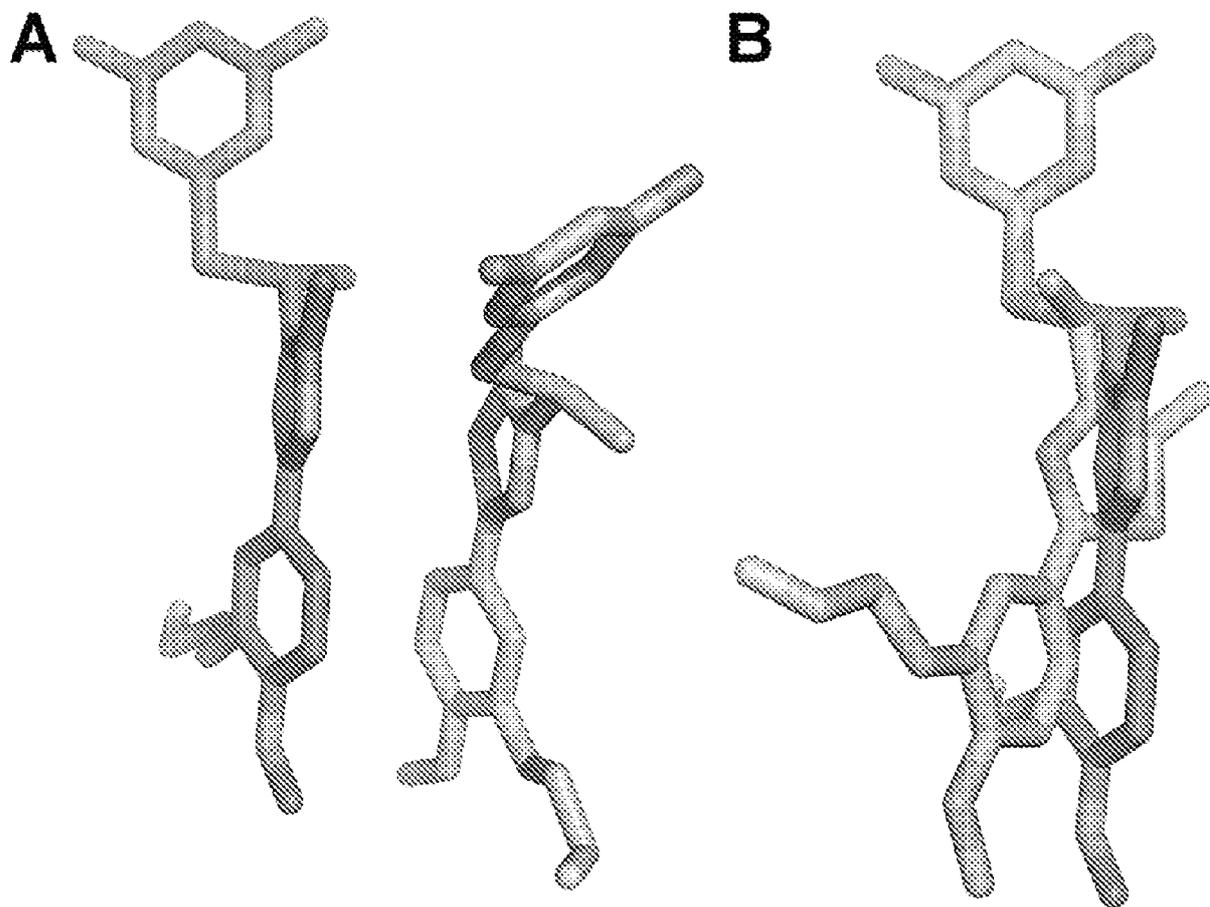


Соединение 7

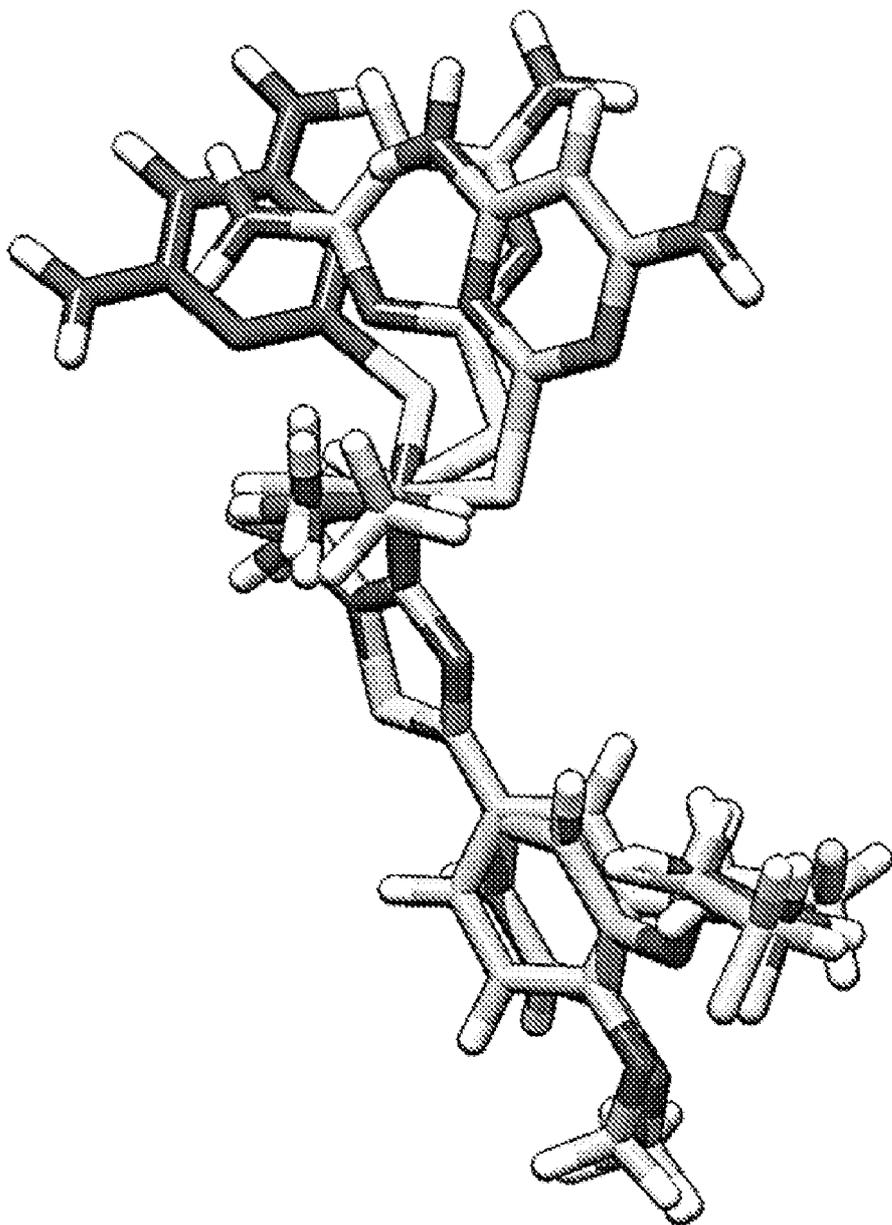


Соединение 8R/S

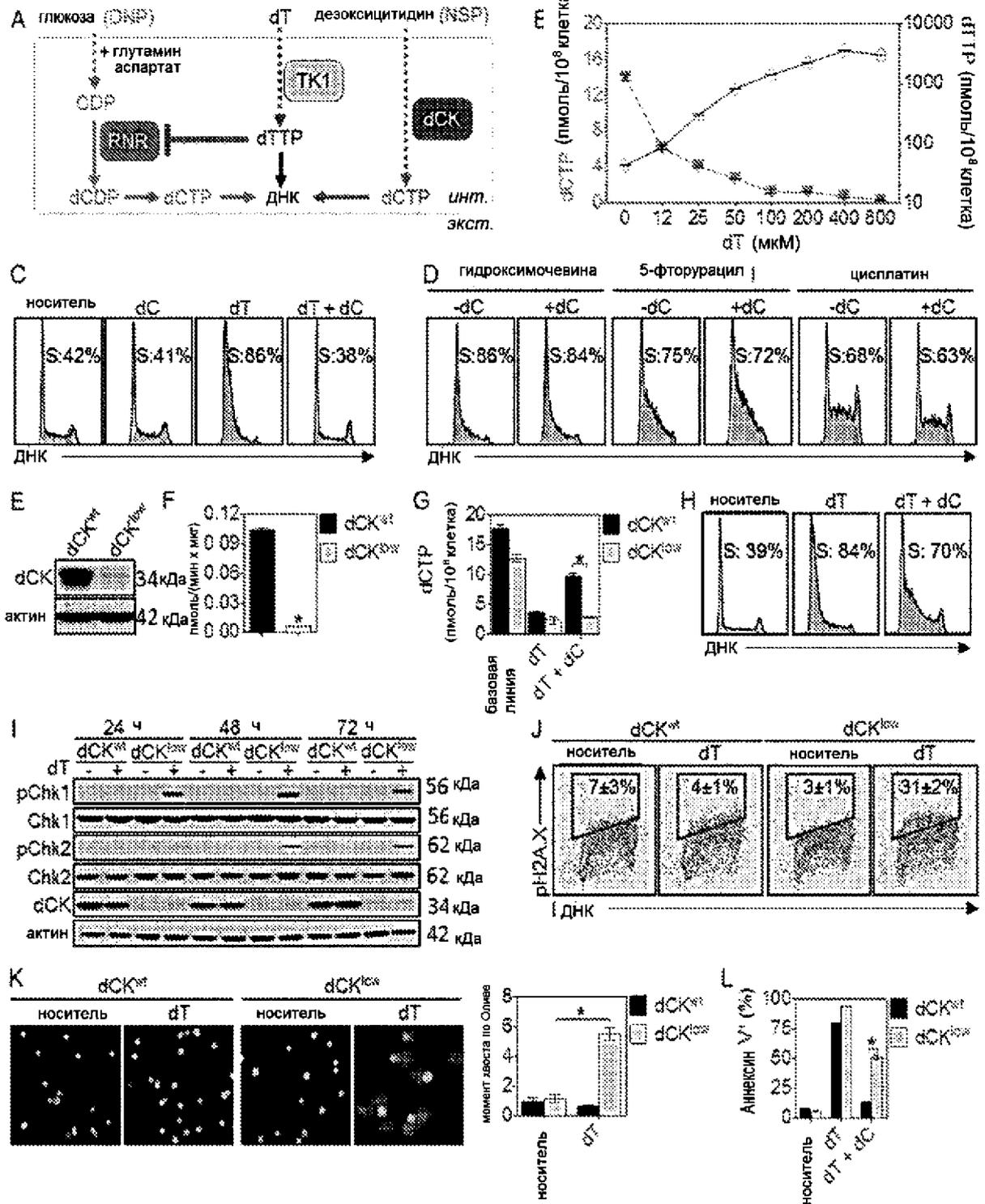
Фигура 14



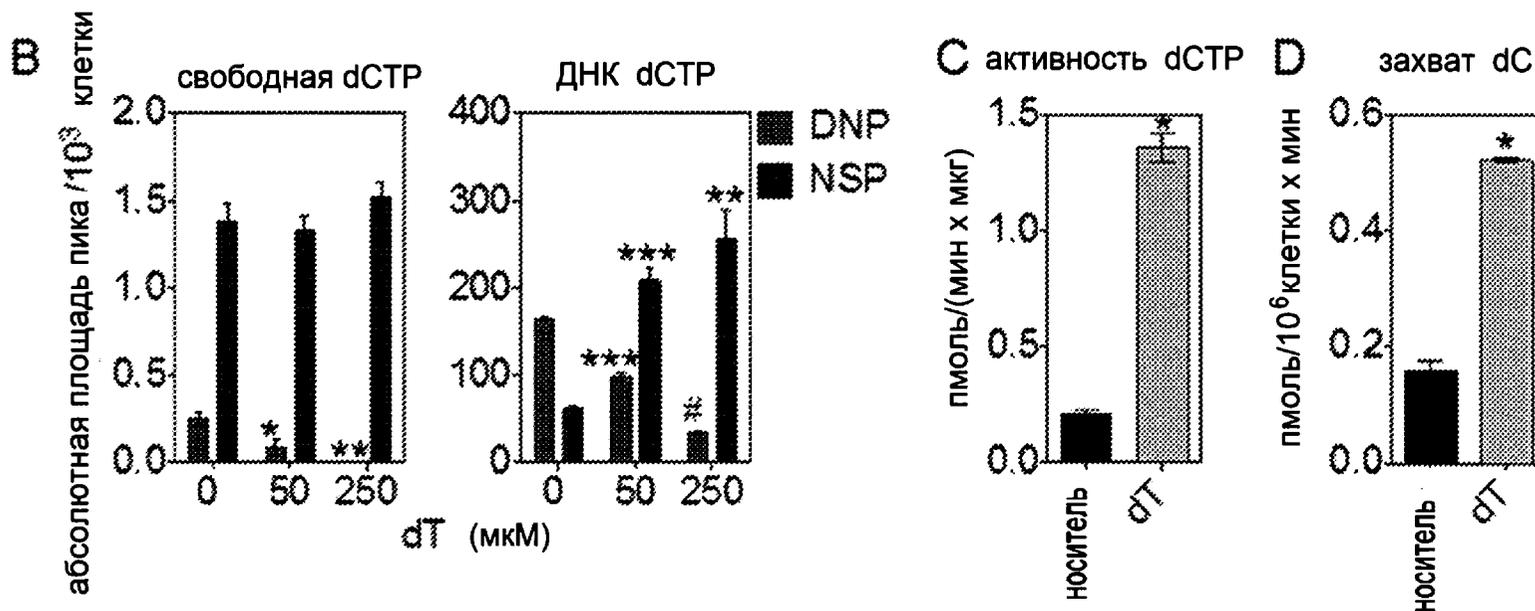
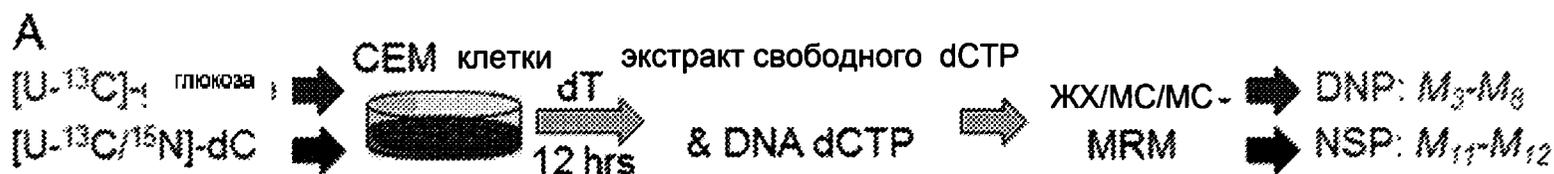
Фигура 15



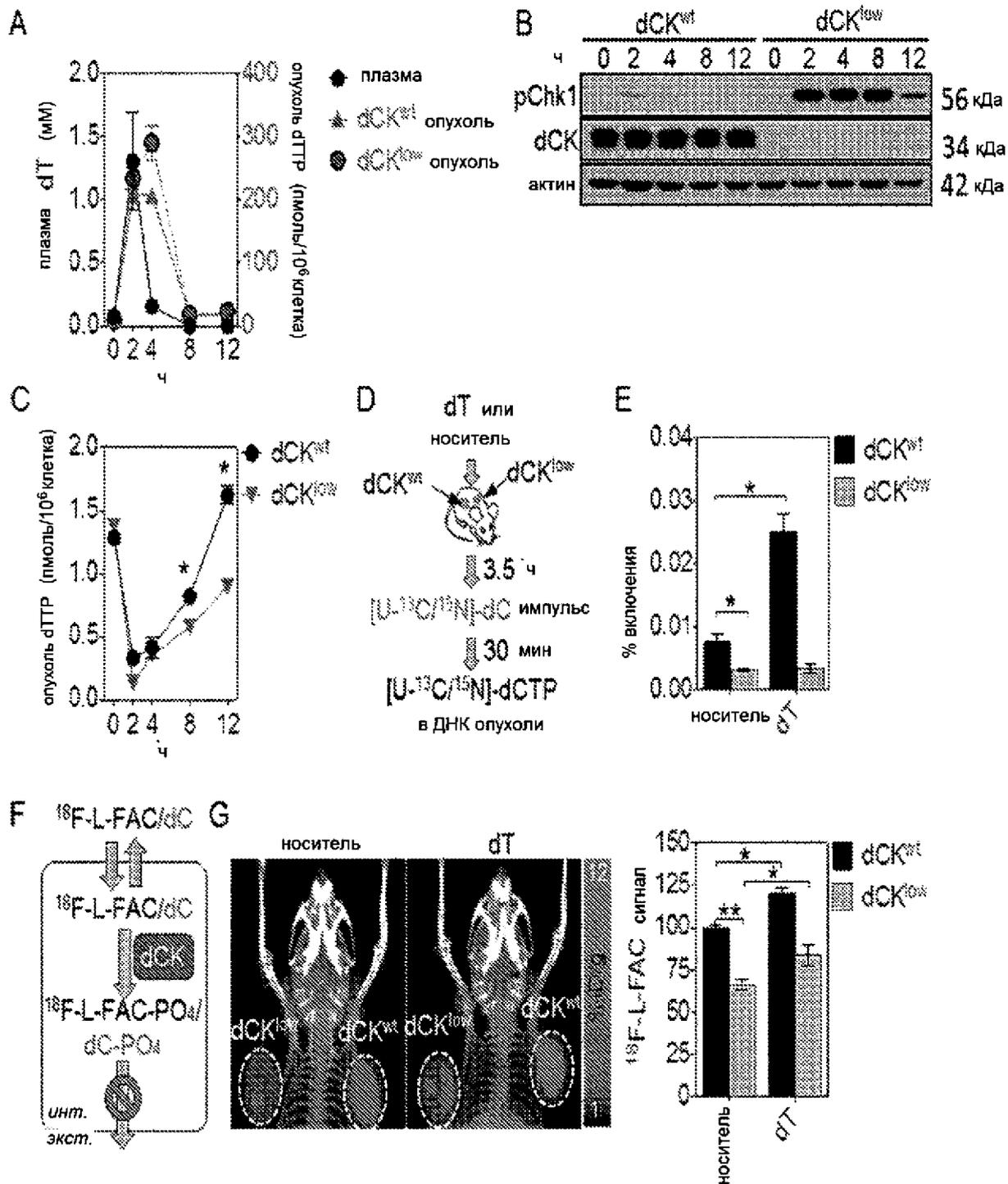
Фигура 16



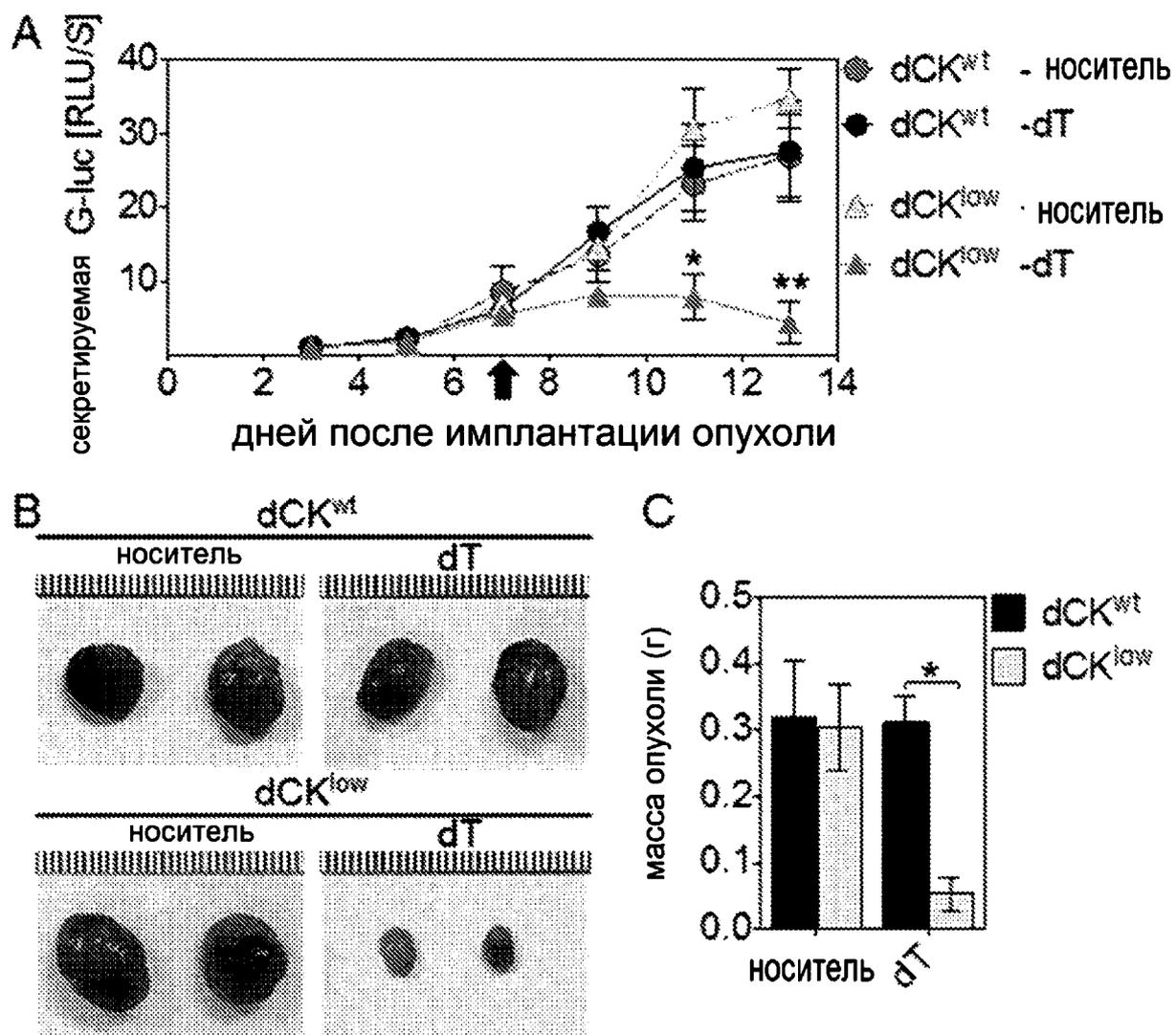
Фигура 17



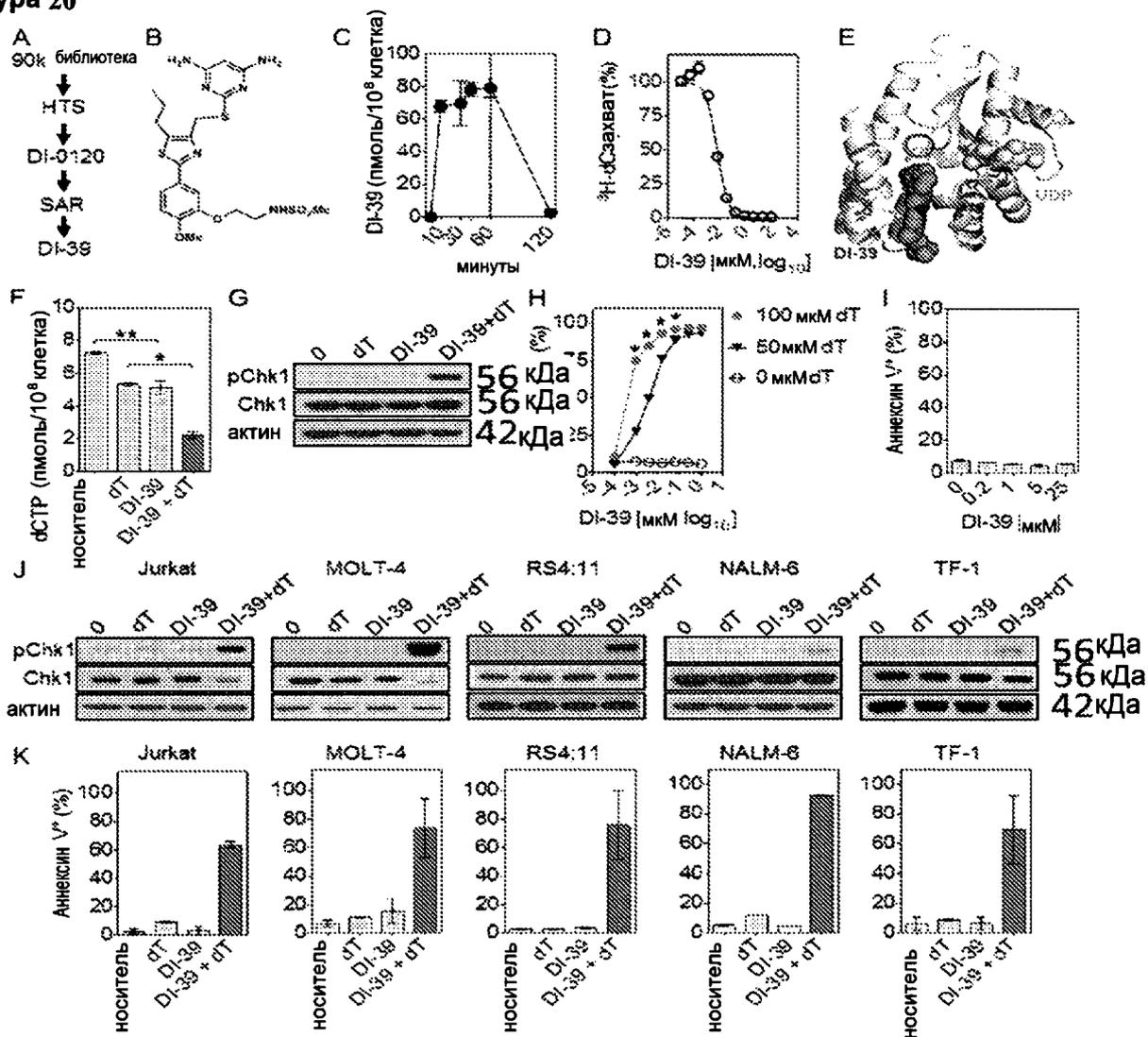
Фигура 18



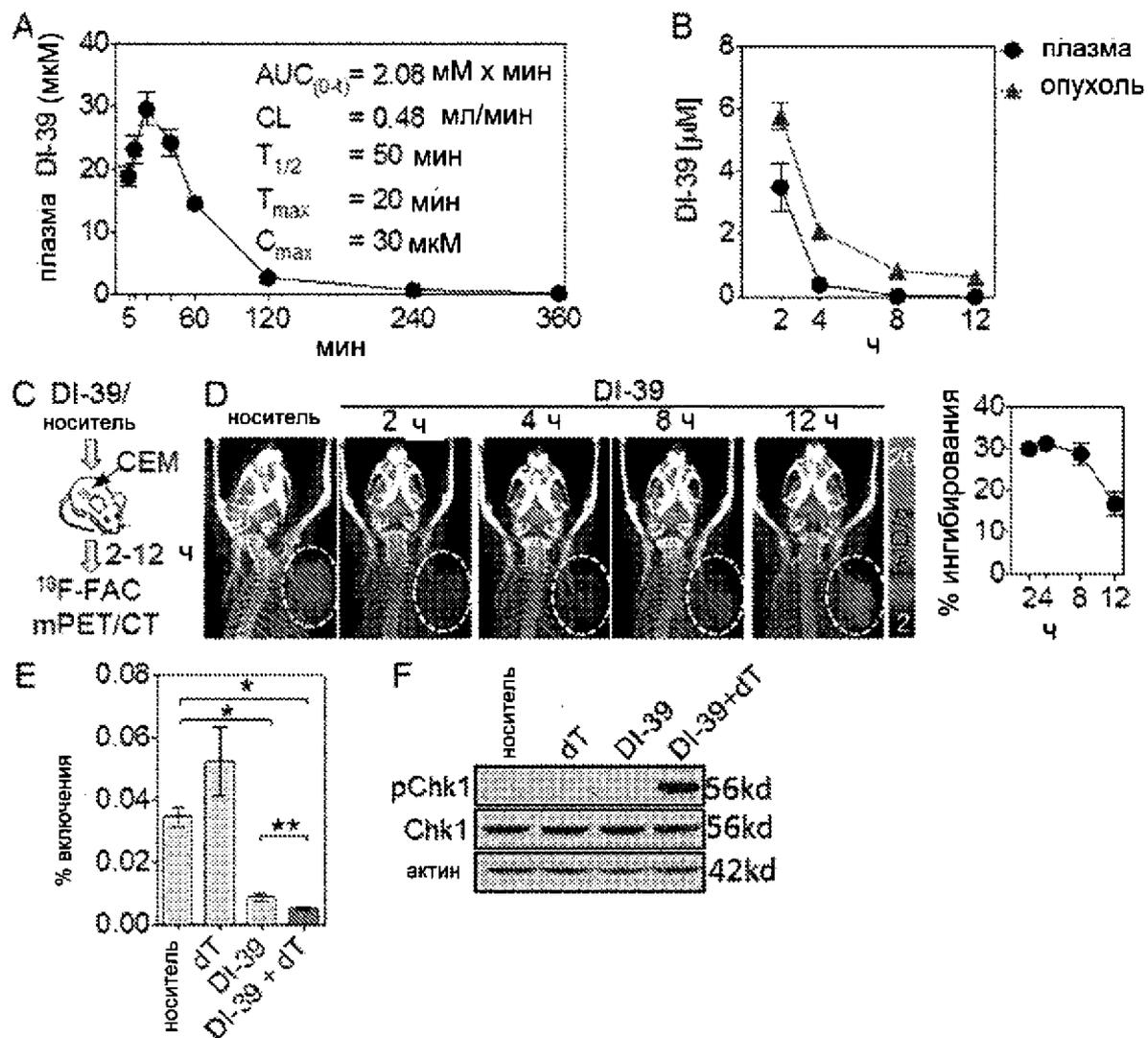
Фигура 19



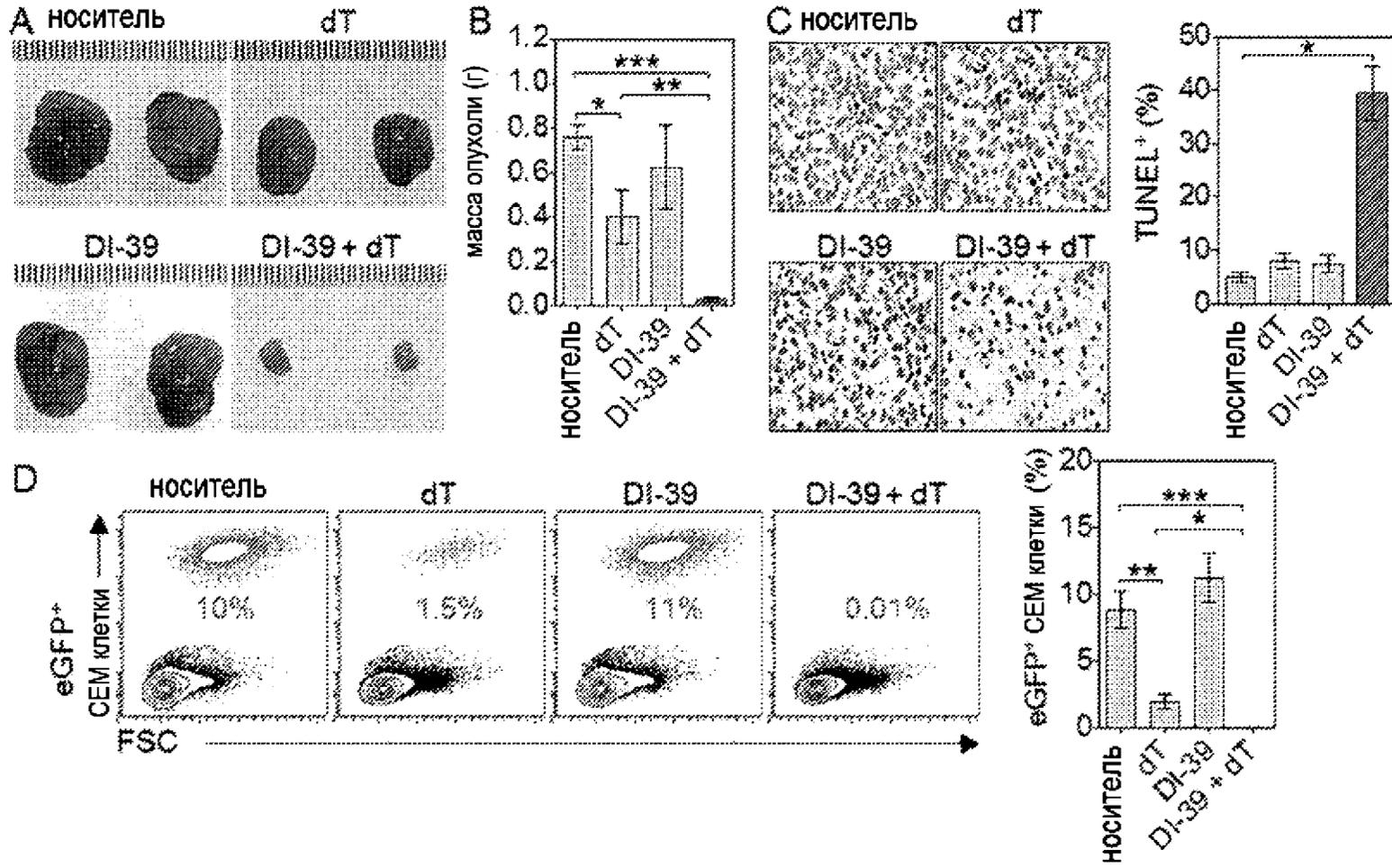
Фигура 20



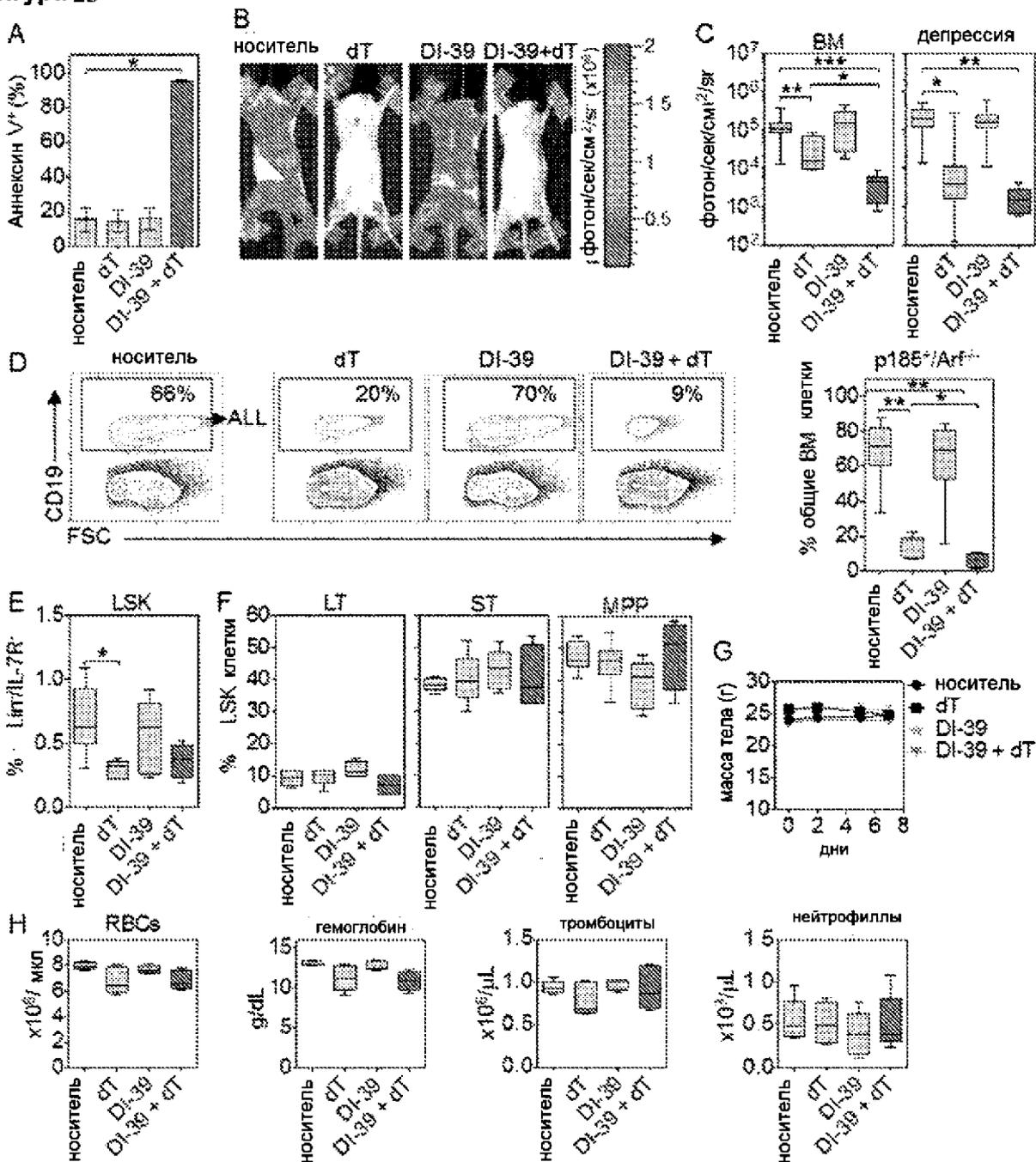
Фигура 21



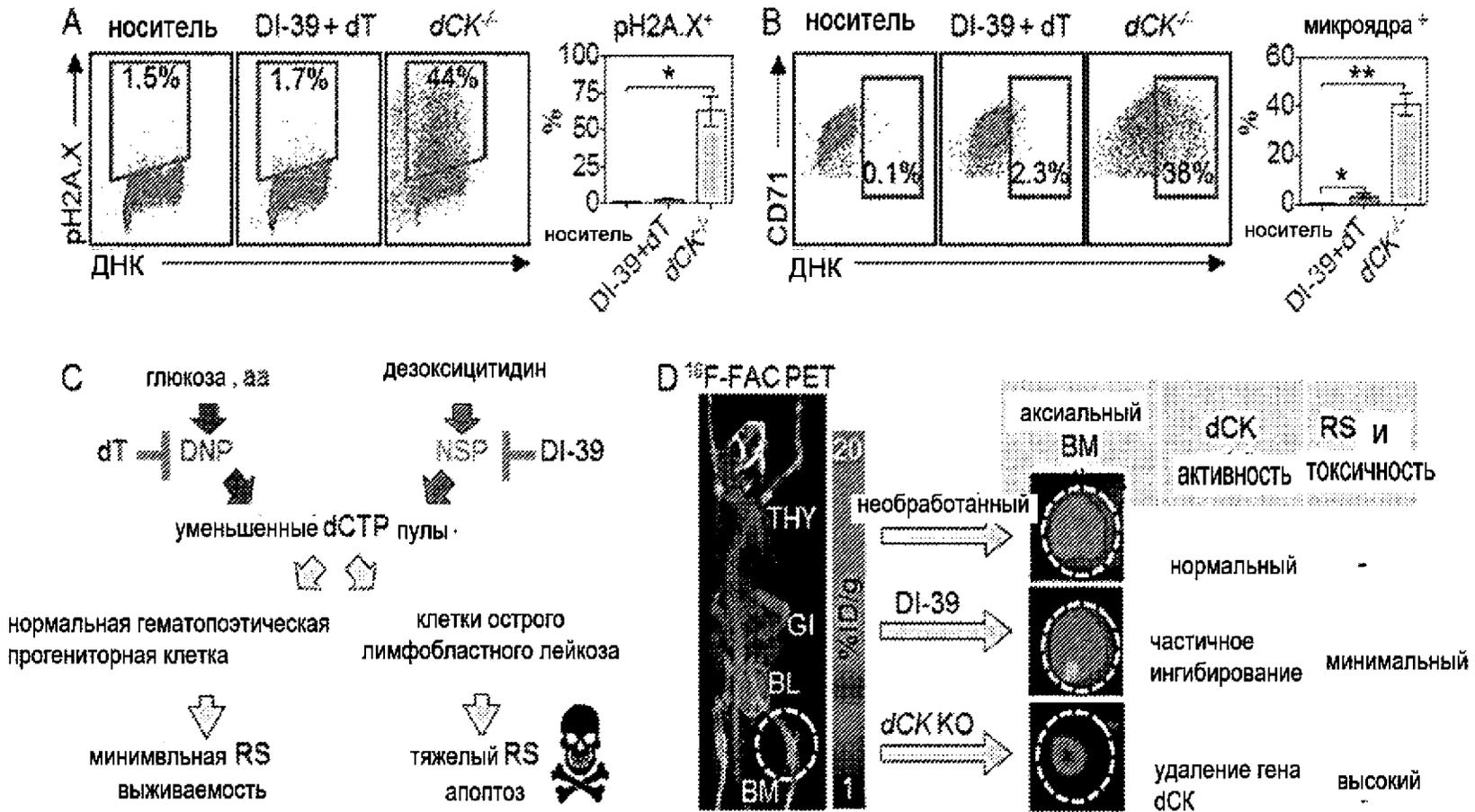
Фигура 22



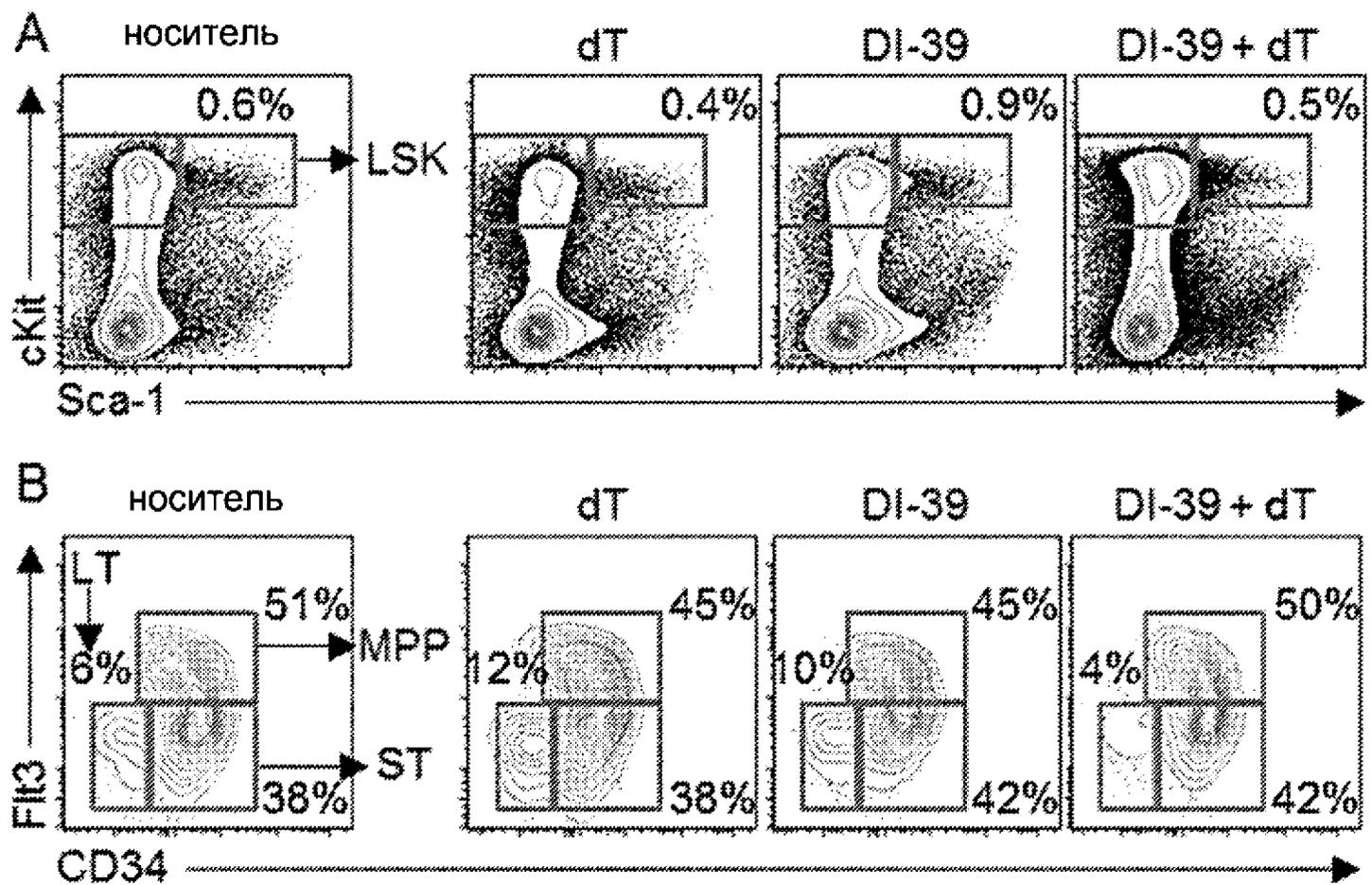
Фигура 23



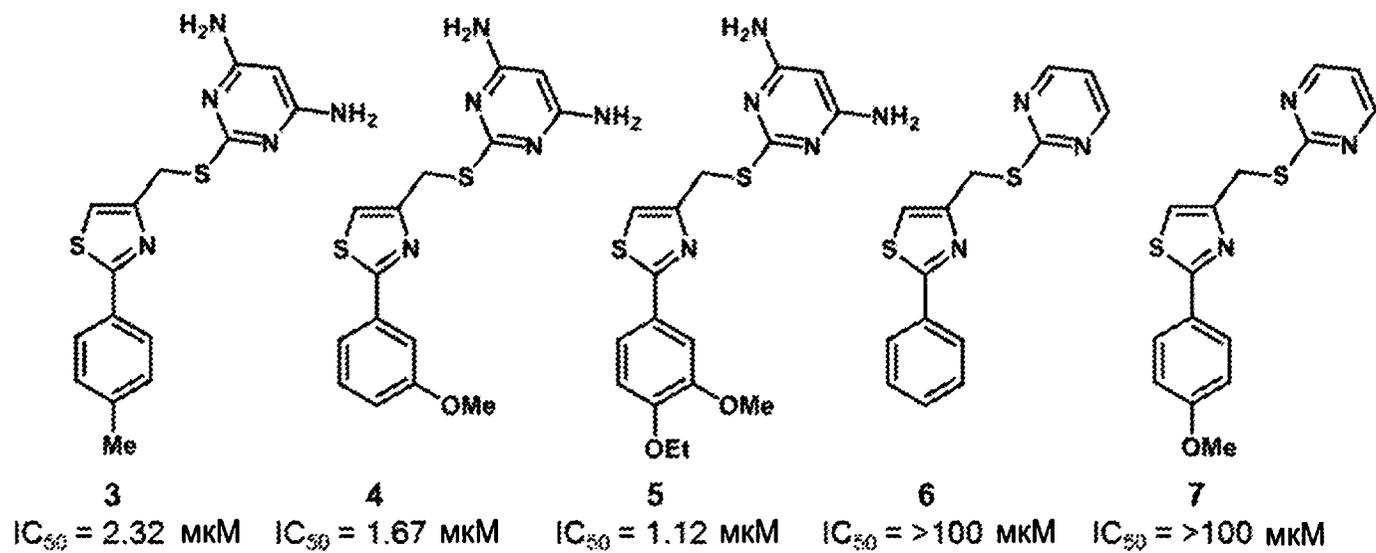
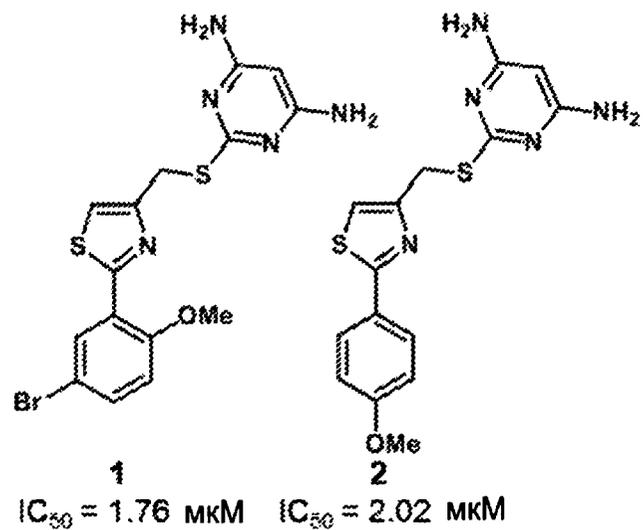
Фигура 24



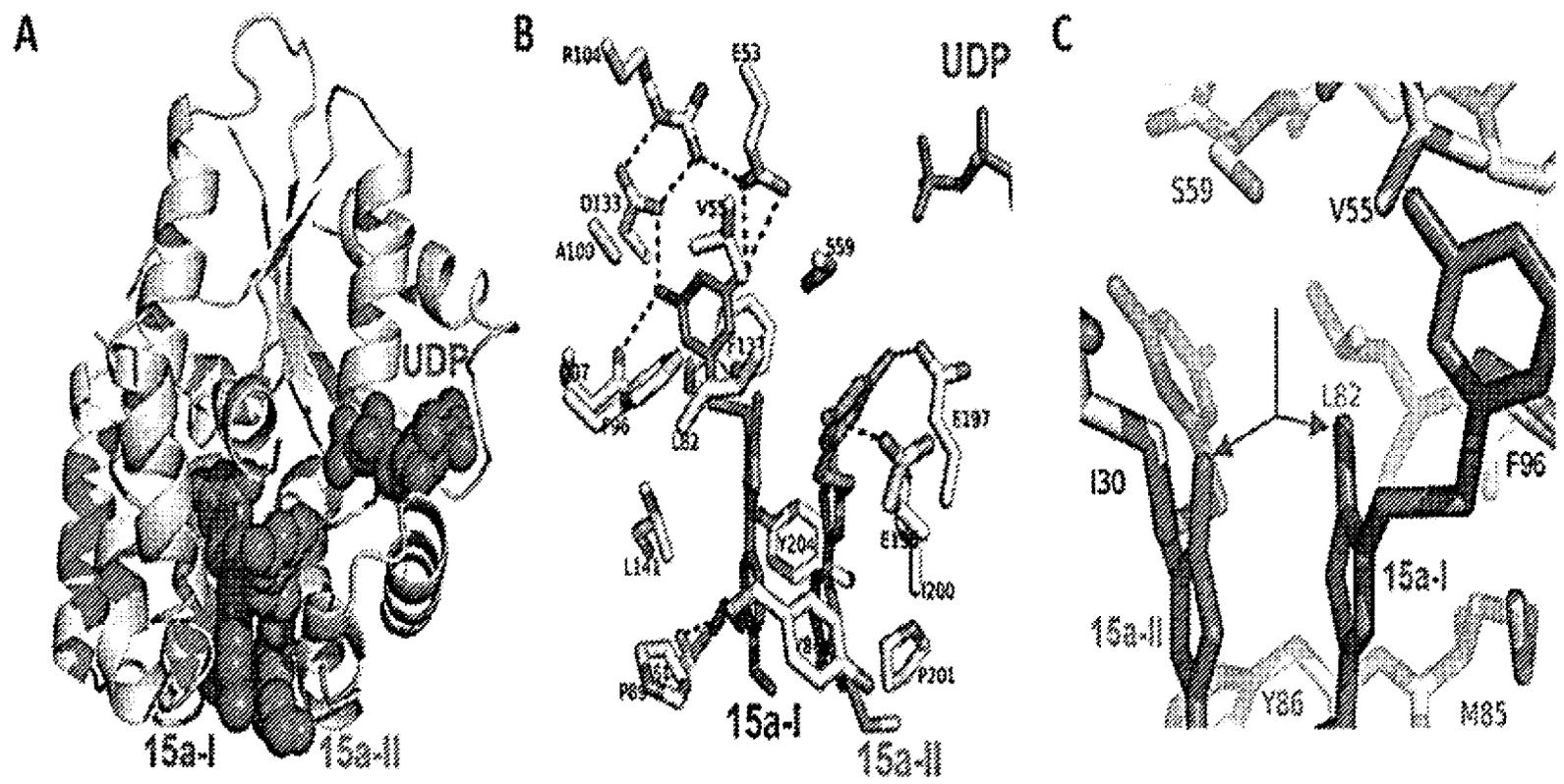
Фигура 25



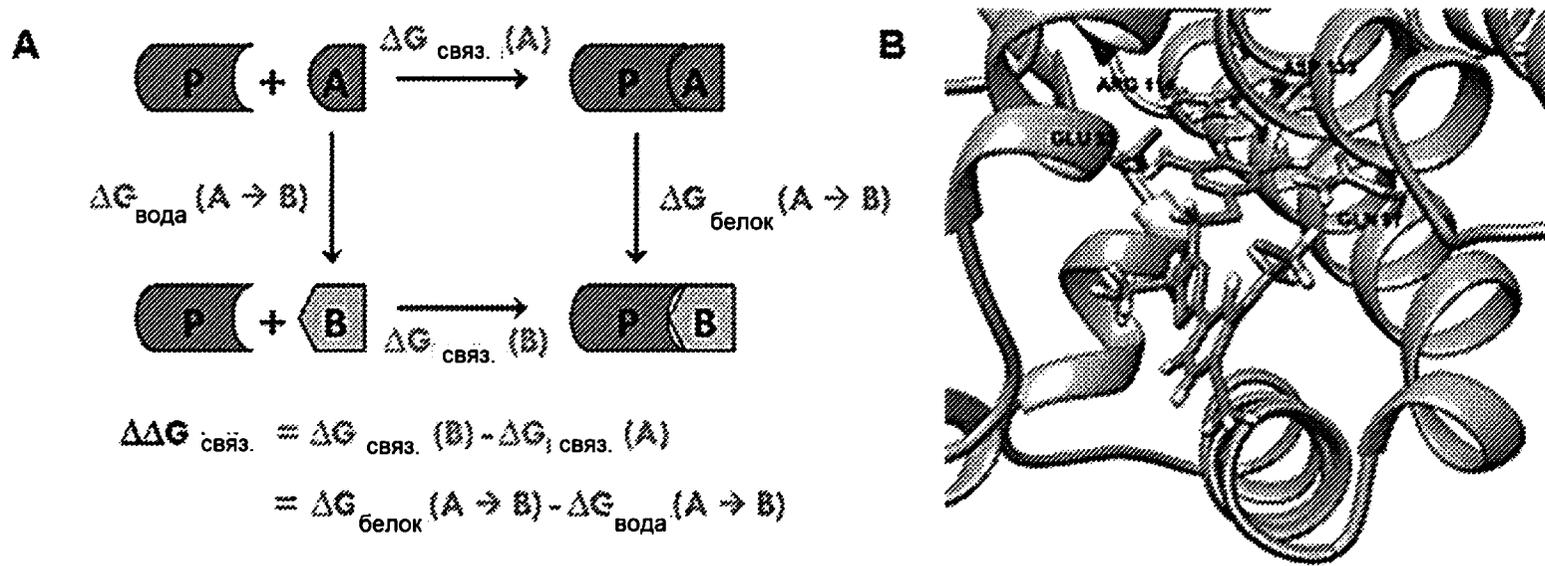
Фигура 26



Фигура 27



Фигура 28

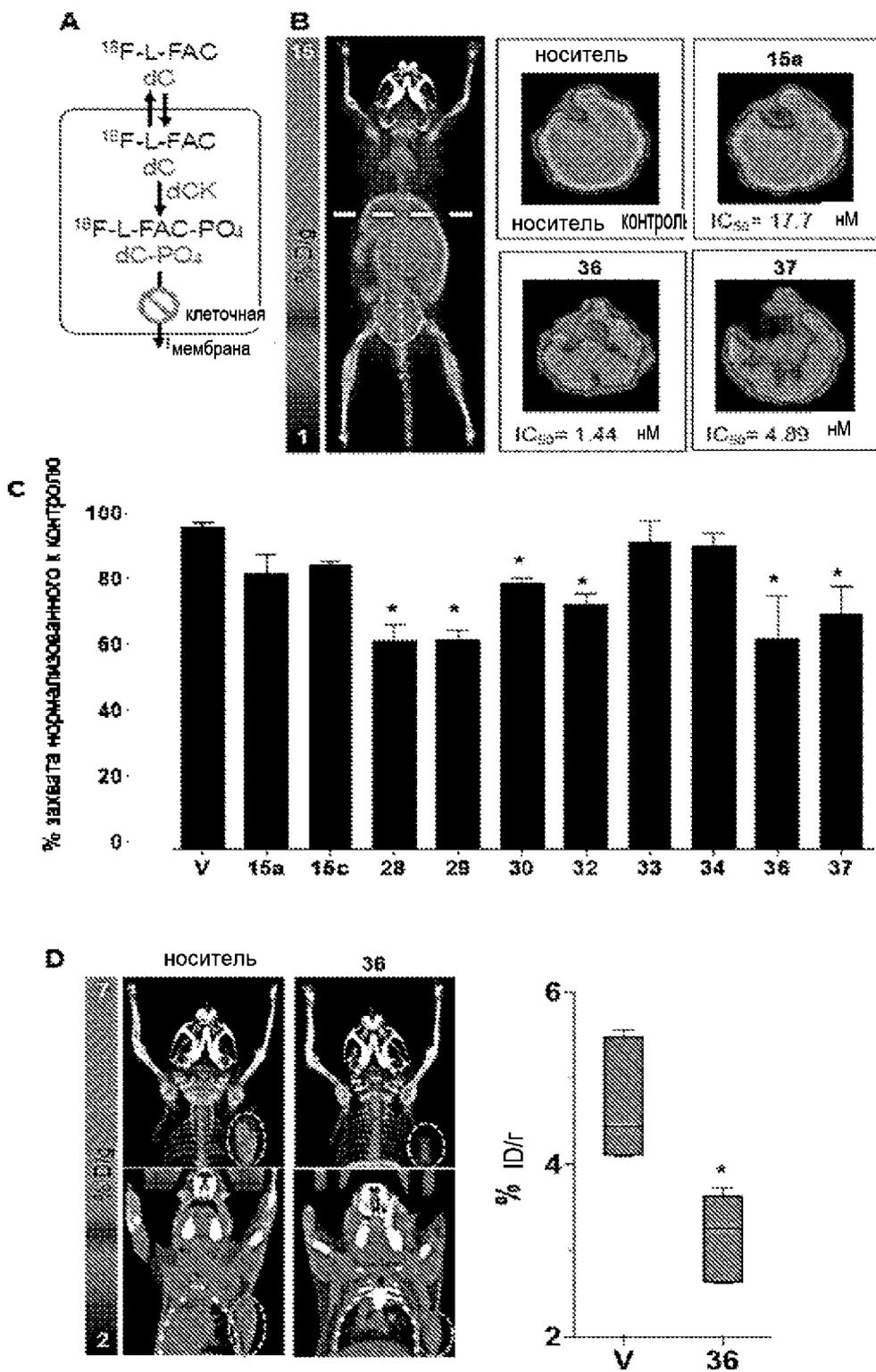


$$\begin{aligned} \Delta\Delta G_{\text{связ.}} &= \Delta G_{\text{связ.}}(\text{B}) - \Delta G_{\text{связ.}}(\text{A}) \\ &= \Delta G_{\text{белок}}(\text{A} \rightarrow \text{B}) - \Delta G_{\text{вода}}(\text{A} \rightarrow \text{B}) \end{aligned}$$

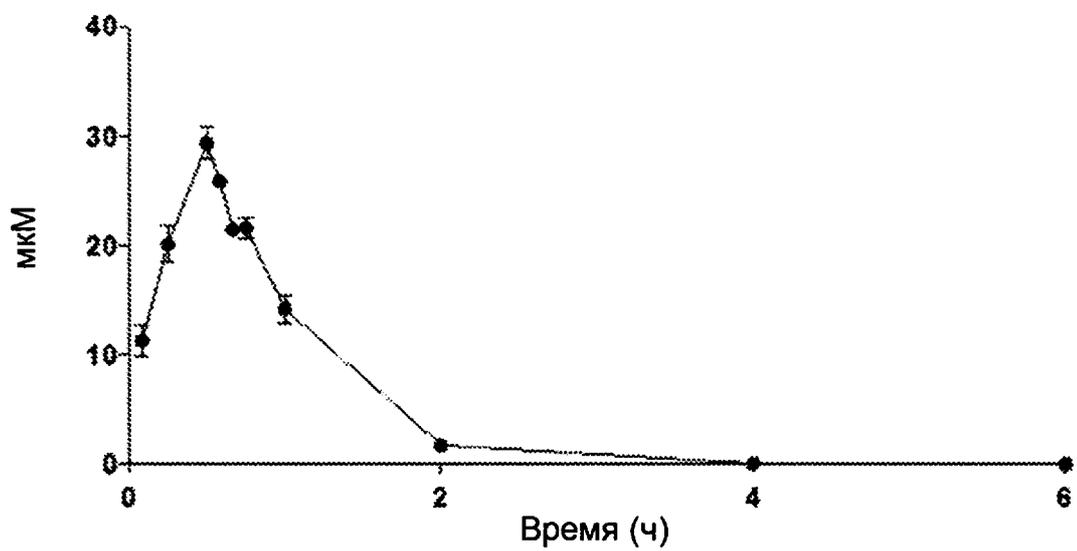
**C**

	$\Delta G_{\text{белок}}$	$\Delta G_{\text{вода}}$	$\Delta\Delta G_{\text{связ.}}$
15b - 15c	$1.964 \pm 0.050$	$2.802 \pm 0.046$	$-0.838 \pm 0.068$
15c - 15b	$-1.251 \pm 0.029$	$-2.832 \pm 0.046$	$1.581 \pm 0.054$
среднее значение			1.210 в пользу 15c

Фигура 29



Фигура 30



	Доза (мг/кг)	$AUC_{(0-4)}$ (мг/мл x мин)	$T_{1/2}$ (мин)	$T_{max}$ (мин)	$C_{max}$ (MKM)
36	50	.832	30	30	30

